

Méthode d'analyse en santé des végétaux

RÉFÉRENCE : ANSES/LSV/MA032- Version 2

Septembre 2017

Détection de *Plasmopara halstedii* par PCR en temps réel duplex

Laboratoire de la santé des végétaux
Laboratoire national de référence « Champignons sur toute matrice »

Le présent document est, sous sa forme électronique, mis à la disposition des utilisateurs en tant que méthode d'analyse. Ce document est la propriété de l'Anses. Toute reproduction, qu'elle soit totale ou partielle, n'est autorisée qu'à la condition expresse que la source soit citée, par exemple en faisant mention de sa référence (incluant sa version et année) et de son titre.



Historique de la méthode

Une méthode peut être mise à jour afin de prendre en compte des modifications.

Une modification est considérée comme majeure dès lors qu'elle concerne des parties clés ou le fond même de la méthode, dont la prise en compte est susceptible d'améliorer significativement la portée ou le résultat de la méthode d'analyse. Une modification majeure induit en général des adaptations importantes. La méthode ainsi modifiée a fait l'objet d'une nouvelle validation.

Une modification est considérée comme mineure si elle apporte des précisions utiles ou pratiques, reformule les propos pour les rendre plus clairs ou plus précis, rectifie des erreurs bénignes. Les caractéristiques de performance de la méthode ainsi améliorée ne sont pas modifiées; elle n'a pas fait l'objet d'une nouvelle validation.

Le tableau ci-dessous récapitule l'historique des versions de la présente méthode.

Version	Nature des modifications	Date	Principales modifications
v1a		Octobre 2013	Version initiale
v1b	mineures	Mai 2014	<ul style="list-style-type: none">• Passage de l'analyse en triplicata à l'analyse en duplicata des extraits d'ADN• Simplification de certains passages pour rendre la méthode plus lisible.
V2 *	mineures	Septembre 2017	<ul style="list-style-type: none">• Changement de format de présentation de la méthode• Mise à jour des règles de décision et de leur présentation• Changement du seuil de positivité d'un réplikat de PCR pour la cible• Modification du mode d'évaluation du poids de 1000 grains

* La version 2 a fait l'objet d'une consultation du public du 02 mars 2017 au 02 avril 2017 sur le site internet de l'agence.



Avant-propos

La présente méthode a été développée par :

Anses - Laboratoire de la Santé des Végétaux, Unité de Mycologie

Laboratoire National de Référence Champignons phytopathogènes sur toute matrice

Adresse : Domaine de Pixérécourt, Bâtiment E, CS40009, 54220 Malzéville

Contact : nancy.lsv@anses.fr

La présente méthode a été initialement mise au point, optimisée et évaluée par l'unité de mycologie du Laboratoire de la Santé des Végétaux (loos *et al.* 2012).

La méthode a été révisée par l'unité de mycologie du Laboratoire de la Santé des Végétaux.

Le travail de relecture a été effectué par l'Unité de Coordination de la Référence du Laboratoire de la Santé des Végétaux.



Sommaire

Avant-propos.....	3
Introduction	5
Avertissements et précautions de sécurité	6
1 Objet et domaine d'application	7
2 Documents de référence.....	7
3 Termes, sigles et définitions	7
4 Principe de la méthode	8
5 Réactifs	9
5.1 Eau	9
5.2 Kits d'extraction d'ADN.....	9
5.3 Oligonucléotides.....	9
5.4 Kit de PCR en temps-réel.....	9
5.5 Autres consommables à usage unique.....	10
5.6 Contrôles et témoins	10
6 Appareillage et matériels	11
7 Échantillons.....	12
7.1 Conditions d'acceptation des échantillons	12
7.2 Conservation des échantillons avant analyse.....	13
7.3 Conservation des échantillons ou reliquats après analyse	13
8 Mode opératoire.....	13
8.1 Préparation des échantillons pour analyse	13
8.2 Broyage des prises d'essai et extraction de l'ADN total	13
8.3 Test de détection par PCR en temps réel duplex	14
9 Résultats.....	16
9.1 Contrôle de la validité des résultats	16
9.2 Calculs et expression des résultats	17
10 Caractéristiques de performance de la méthode	18
Annexe 1 : Tables décisionnelles	20
Bibliographie.....	21



Introduction

Plasmopara halstedii est l'agent du mildiou du tournesol. Ce parasite obligatoire est devenu économiquement important parce qu'il cause des pertes de rendements parfois très conséquentes dans les champs qu'il affecte, mais aussi à cause des coûts de protection phytosanitaire et de sélection génétique qu'il implique. Afin de prévenir l'introduction de nouveaux génotypes agressifs et d'isolats résistants aux fongicides dans des aires de production de tournesol, des mesures phytosanitaires strictes sont requises. Les semences représentant le principal vecteur de *P. halstedii* sur de longues distances, une méthode efficace de contrôle phytosanitaire des graines est essentielle afin de limiter la dissémination du parasite.



Avertissements et précautions de sécurité

Il convient que l'utilisateur de la présente méthode connaisse bien les pratiques courantes de laboratoire. Il incombe à l'utilisateur d'établir des pratiques appropriées en matière d'hygiène et de sécurité, et de s'assurer de la conformité à la réglementation en vigueur.

Il est essentiel que les manipulations conduites conformément à la présente méthode soient exécutées par du personnel ayant reçu une formation appropriée.

Conformément à l'arrêté du 31 juillet 2000 (Directive 2000/29/CE) relatif aux exigences sanitaires des végétaux ou produits végétaux (Annexe II, Partie AII) *Plasmopara halstedii* est considéré comme organisme de quarantaine en tant qu'organisme nuisible dont l'introduction et la dissémination doivent être interdites dans tous les états membres s'il se trouve sur graines de tournesol.

Élimination des matériels susceptibles d'être contaminants :

Le laboratoire doit mettre en œuvre des mesures prenant en compte ces risques pour garantir la non dissémination de l'organisme nuisible dans l'environnement.

Les tubes et autres consommables plastiques ayant été utilisés pendant la phase d'extraction - purification d'ADN total peuvent être éliminés sans traitement particulier (plus de parasite viable à ce stade).

Les tubes et autres consommables plastiques ayant été utilisés lors de la phase de préparation du mix et chargement des solutions d'ADN (S_{ADN}) peuvent être éliminés sans traitement particulier.



1 Objet et domaine d'application

L'objet de cette méthode est de détecter la présence de *P. halstedii* dans un échantillon de graines d'*Helianthus annuus*. La présence de *P. halstedii* est mise en évidence par un test de détection par PCR (Polymerase Chain Reaction) en temps réel.

Cette méthode est qualitative, elle permet de détecter *P. halstedii* dans la limite du seuil de détection de la technique employée sans objectif de quantification.

Les échantillons pour lesquels une réponse négative est obtenue sont considérés comme indemnes de *P. halstedii* ou contaminés à un niveau trop faible pour être mis en évidence par la technique utilisée.

La fréquence d'infection des semences par *P. halstedii* peut être relativement faible et les semences infectées ne présentent pas de symptôme. La méthode utilisée permet de traiter un grand nombre de graines simultanément par une amplification par polymérisation en chaîne en temps réel (real-time PCR). L'utilisation d'amorces et d'une sonde marquée, dont la combinaison est spécifique de *P. halstedii*, permet de détecter et d'amplifier des portions discriminantes de l'ADN génomique de ce champignon. La détection s'effectue dans un extrait d'ADN total obtenu à partir de prises d'essai de graines broyées.

Cette technique permet de détecter l'organisme cible quel que soit son état physiologique.

Objets susceptibles d'être soumis à analyse : Cette méthode s'applique uniquement aux semences d'*Helianthus annuus*.

Limitations relatives aux objets susceptibles d'être soumis à analyse : Cette méthode a été mise au point et validée sur des semences d'*Helianthus annuus* sans enrobage phytosanitaire. L'effet d'un éventuel enrobage sanitaire sur la qualité de l'analyse utilisant cette méthode est inconnu.

Grandeur de l'objet soumis à analyse : La taille de l'échantillon de semences reçu au laboratoire pour recherche de *P. halstedii* doit permettre le prélèvement d'un échantillon pour analyse d'environ 1000 graines.

2 Documents de référence

- [1] MOA 022 : Techniques qualitatives d'amplification enzymatique des acides nucléiques : PCR (Polymerase Chain Reaction), RT-PCR (Reverse Transcription-PCR) et PCR temps réel. Détection des organismes phytopathogènes

3 Termes, sigles et définitions

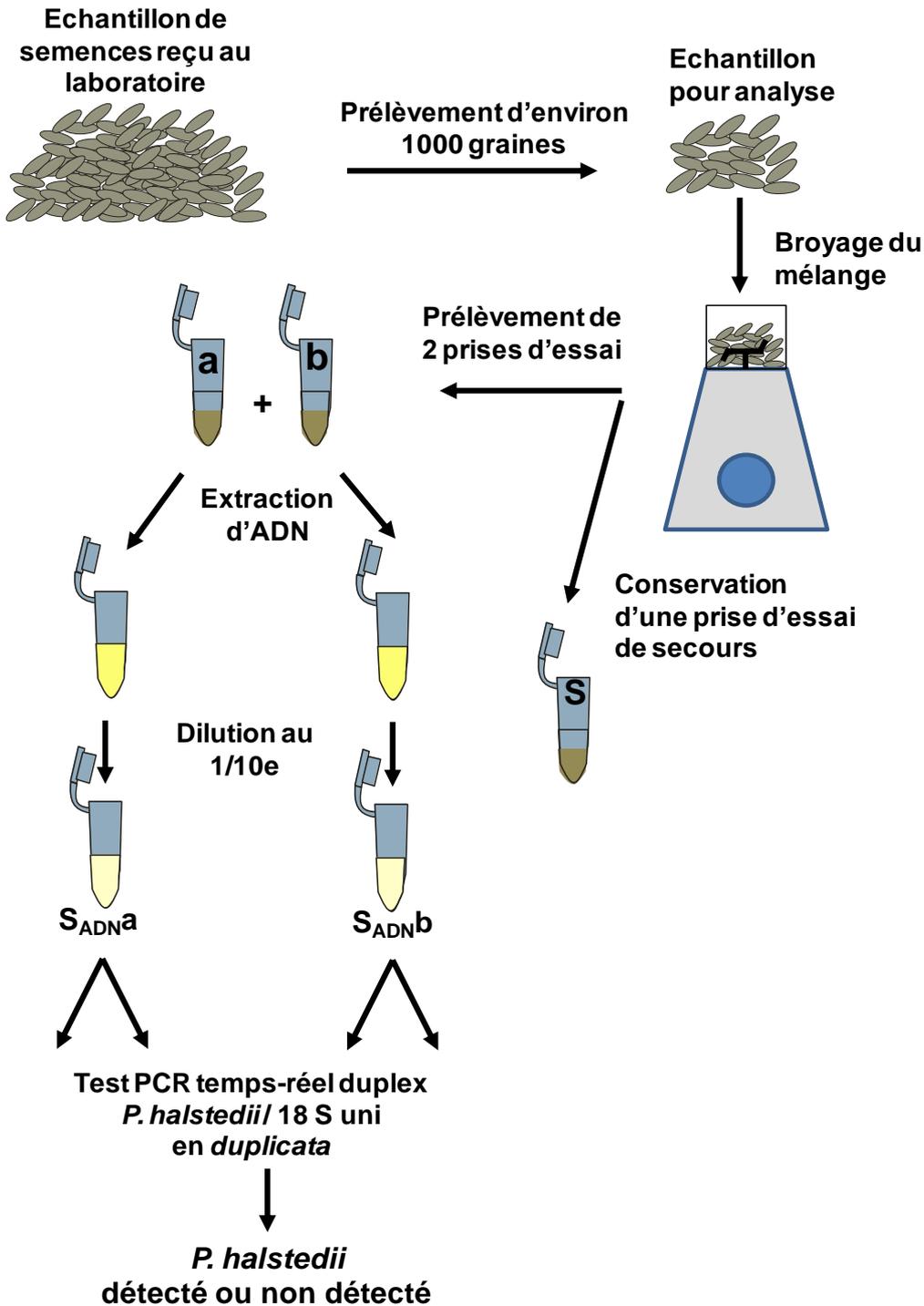
Afin de limiter les problèmes d'interprétation des termes employés, le vocabulaire utilisé dans la présente méthode d'analyse est issu des normes, guides ou glossaires nationaux ou internationaux appropriés (AFNOR, ISO, CIPV, OEPP...).

Le glossaire GLO-001 reprend les principales définitions. L'attention des lecteurs est attirée sur le fait que les termes intégrés au glossaire ne sont, en règle générale, pas spécifiquement repérés dans le corps de la méthode d'analyse.



4 Principe de la méthode

Le principe de la méthode est présenté dans le schéma ci-dessous :





5 Réactifs

Avertissement : Des appellations commerciales ou fournisseurs peuvent être mentionnés dans le descriptif des produits nécessaires à la mise en œuvre de la présente méthode. Cette information est donnée à l'intention des utilisateurs de la méthode et ne signifie nullement que l'Anses recommande l'emploi exclusif de ces produits. Des produits équivalents peuvent être utilisés s'il est démontré qu'ils conduisent aux mêmes résultats de performance.

En règle générale, le manipulateur doit veiller (par l'utilisation de produits et consommables certifiés, nettoyage, stérilisation ou tout autre traitement approprié) à l'absence dans l'eau, produits et consommables utilisés, de contamination (ADN ou ARN), de nucléase, d'inhibiteur ou de tout autre élément pouvant influencer sur le résultat.

Les recommandations des fournisseurs concernant les conditions de stockage avant utilisation seront suivies, ainsi que la conservation en cours d'utilisation. A défaut le laboratoire définira les conditions qu'il jugera satisfaisantes.

5.1 Eau

L'eau ultra pure (EUP) doit présenter une qualité suffisante pour une utilisation en biologie moléculaire.

5.2 Kits d'extraction d'ADN

L'ADN total des échantillons analysés (à la fois ADN végétal, ADN fongique, et éventuellement bactérien, viral etc.) est extrait et purifié à l'aide d'un mini kit d'extraction d'ADN de plante disponible dans le commerce. Le kit initialement validé pour cette méthode est NucleoSpin Plant II (Macherey-Nagel) (loos *et al.*, 2012, dossier LNR de validation de la méthode MOA032).

5.3 Oligonucléotides

Cible	Amorce ou sonde	Sequence (5'-3')
<i>P. halstedii</i>	qPhal-F ^a qPhal-R ^a qPhal-P ^a	TTCCAGTGTCTATAATCCGTGGT GCACATACGCCGAGCGTA [FAM]-TCGGCGAGCGTGTGCGTGT-[BHQ1]
Plante/champignon	18S uni-F ^b 18S uni-R ^b 18S uni-P ^b	GCAAGGCTGAACTTAAAGGAA CCACCACCCATAGAATCAAGA [JOE]-ACGGAAGGGCACCACCAGGAGT-[BHQ1]

^a (loos *et al.*, 2012)

^b (loos *et al.*, 2009)

Les fluorophores rapporteurs utilisés pour chaque sonde peuvent être modifiés, sous réserve que le fluorophore extincteur associé soit adapté.

5.4 Kit de PCR en temps-réel

Le kit initialement validé pour cette méthode est le qPCR Core kit No ROX (Eurogentec) (loos *et al.*, 2012, dossier LNR de validation de la méthode MOA032).



5.5 Autres consommables à usage unique

- Microcônes stériles à filtre de volume adaptés
- Microtubes stériles de 2 ml
- Microtubes ou capillaires stériles pour PCR de volume adapté au thermocycleur temps réel utilisé, à paroi fine, individuels, en barrette de 4, 8 ou en plaque de 96.

5.6 Contrôles et témoins

La technique de détection de régions cibles d'ADN d'un organisme par la technique de PCR en temps réel impose l'utilisation d'une série de contrôles et témoins permettant de valider la bonne qualité de la manipulation. Ces contrôles et témoins ont différentes fonctions et leur utilisation permet de garantir que :

- l'opérateur a correctement suivi le protocole,
- les consommables et réactifs utilisés étaient de qualité suffisante,
- les volumes prélevés par micropipettes, les températures et durées de réaction, la concentration et le pH des solutions utilisées étaient corrects,
- l'extrait d'ADN était suffisant en quantité et amplifiable (pas d'interférence avec des composés inhibiteurs),
- qu'il n'y a pas eu de contamination accidentelle des échantillons testés.

Les contrôles à produire au cours de l'analyse sont à *minima* les suivants :

- Un contrôle de la qualité de l'extraction d'ADN et de la présence d'inhibiteur sera réalisé pour chaque prise d'essai. Il prendra la forme d'un test PCR temps réel utilisant la combinaison d'amorces / sonde 18S uni -F/-R/-P. Ce test permet de générer un signal de fluorescence de nature exponentielle significativement supérieur au bruit de fond si de l'ADN de plante ou de champignon est présent dans un extrait, sans effet inhibiteur suffisant (loos *et al.*, 2012). Toutefois, les prises d'essai qui sont positives pour le test qPhal-F-R-P ne nécessiteront pas systématiquement de contrôle de la qualité d'ADN. Ce test sera réalisé dans la même réaction que le test de détection de *P. halstedii* (duplex). En revanche, l'analyse des courbes de fluorescence 18S uni-F/-R/-P se limitera aux données acquises lors des 30 premiers cycles exclusivement. Une S_{ADN} sera dite positive pour le test 18S uni si le Ct (Cycle threshold, cycle seuil) ou le Ct moyen généré est dans une gamme de Ct acceptable, préalablement déterminée expérimentalement par le laboratoire, sur ce type de matrice (semences de tournesol) dans ses propres conditions. *Dans les conditions de développement et de validation de ce test, la valeur maximale acceptable de Ct pour le test 18S uni a été déterminée à 17.2 (Dossier LNR de validation de la méthode MOA032).*
- Un témoin négatif de processus (T_{-PROC}) ou un témoin négatif d'extraction (T_{-extr}) sera préparé pour toute série d'extractions. Une prise d'échantillon "vide" (= " T_{-extr} "), c'est à dire un microtube de 2 ml stérile vide, subira donc toutes les phases de l'analyse pour vérifier l'absence de contamination lors de la phase d'extraction d'ADN (1er type de faux positif). Il est possible de remplacer cet échantillon vide par un extrait d'ADN prêt à l'emploi ne



présentant aucun risque d'amplification croisée avec les tests de PCR décrits ci-après ou par un échantillon semences de tournesol reconnu non contaminé par *P. halstedii* (témoin négatif de processus, T-_{PROC}). L'un ou l'autre sera testé en *duplicata* lors de chaque réaction de PCR en temps réel pour vérifier l'absence de contamination croisée entre échantillons ou de contamination externe lors de la phase d'extraction d'ADN.

- Un témoin positif (T+_{18S tournesol}) sera systématiquement testé en *duplicata* lors de chaque réaction de PCR en temps réel 18S uni. Il permet de vérifier que la réaction PCR 18S uni s'est effectuée de façon correcte. Ce T+_{18S tournesol} est constitué d'une solution calibrée de plasmides bactériens dans lesquels est clonée une cible de test PCR 18S uni-F/-R/-P issue d'ADN de semences de tournesol, ou d'une solution d'ADN de semences de tournesol à une concentration similaire à ce qui est obtenu en moyenne à partir d'un échantillon à analyser.
- Un témoin positif en limite pratique de détection (T+_{LOD}) sera systématiquement testé en *duplicata* lors de chaque réaction de PCR en temps réel *P. halstedii*. Il permet de vérifier que la réaction PCR s'est effectuée de façon optimale (conditions thermodynamiques, volumétriques, et chimiques) pour que la plus petite quantité détectable de *P. halstedii* puisse avoir été détectée dans un échantillon par ce protocole. Ce T+_{LOD} est constitué d'une solution calibrée de plasmides bactériens dans lesquels sont clonés la cible du test PCR QPHAL-F/-P/-R. Ce T+_{LOD} doit être caractérisé par le laboratoire dans ses propres conditions. En pratique, le T+_{LOD} peut être défini comme la plus petite quantité de cible produisant un résultat positif dans 100 % des cas.
- Un témoin négatif d'amplification (T- ou NTC, no template control) sera systématiquement introduit en *duplicata* lors de chaque réaction de PCR en temps réel *P. halstedii*. Une prise d'échantillon "eau" subira donc toutes les phases de l'analyse à partir de la préparation du mélange réactionnel de PCR pour vérifier l'absence de contamination lors de cette phase et lors du chargement des **S**_{ADN} dans les tubes individuels de PCR (2^{ème} type de faux positifs).

Ces contrôles ainsi que des contrôles supplémentaires que le laboratoire peut ajouter si nécessaire sont définis par la MOA022.

6 Appareillage et matériels

Avertissement : Des appellations commerciales ou fournisseurs peuvent être mentionnés dans le descriptif des appareils et matériels nécessaires à la mise en œuvre de la présente méthode. Cette information est donnée à l'intention des utilisateurs de la méthode et ne signifie nullement que l'Anses recommande l'emploi exclusif de ces matériels. Des matériels équivalents peuvent être utilisés s'il est démontré qu'ils conduisent aux mêmes résultats de performance.

L'agencement et l'équipement des zones de travail sont définis dans la MOA022.

Les matériels utilisés dans la méthode doivent satisfaire aux exigences de la MOA 022 en vigueur.

Afin d'alléger la lecture de la méthode, seules les valeurs cibles des grandeurs mesurées sont indiquées dans le corps du texte, en unités du système international ou unités dérivées. Les erreurs maximales tolérées (EMT) à prendre en considération sont données dans le tableau ci-après (dans le cas contraire, des spécifications sont précisées dans le texte de la méthode).



Grandeur	EMT
Volume	volume < à 10mL : EMT = $\pm 10\%$
Masse	EMT = $\pm 10\%$
Température	incubateur : EMT = $\pm 3^{\circ}\text{C}$ réfrigérateur : 5°C et EMT = $\pm 4^{\circ}\text{C}$ (ou plus strict en fonction des recommandations fournisseur) congélateur : $\leq -18^{\circ}\text{C}$ en fonction de l'usage thermocycleur* : EMT justesse = $\pm 1^{\circ}\text{C}$; EMT homogénéité = $\pm 2^{\circ}\text{C}$

**Un test biologique (mis en œuvre selon les préconisations de la MOA022) peut venir compléter ou se substituer à la vérification métrologique des thermocycleurs.*

En plus de l'appareillage courant d'un laboratoire de biologie moléculaire, le matériel suivant est jugé nécessaire pour certaines phases de l'analyse :

- Appareil de PCR en temps réel et ordinateur de pilotage capables de mesurer la fluorescence des reporteurs de type « FAM » et « JOE » ou des fluorophores de spectre équivalent. Cette méthode a été initialement développée et validée sur un appareil Rotorgene 6500, Corbett Research.
- Broyeur de graines de volume de broyage adapté et capable de réduire l'échantillon de graines en poudre grossière (de type Microtron Kinematica, Luzerne, Suisse, ou équivalent)
- Petits ustensiles (spatules, scalpels, etc.) pour le prélèvement de poudre de graines
- Poste de sécurité microbiologique pour la préparation des prises d'essai.

7 Échantillons

7.1 Conditions d'acceptation des échantillons

Pour que les échantillons soient acceptés sans réserve, les éléments suivants doivent être respectés :

Nature et état de l'échantillon compatibles avec l'analyse : Les échantillons sont constitués de semences *d'Helianthus annuus* non traitées. Le temps entre le prélèvement et l'arrivée au laboratoire doit être le plus réduit possible. Si les échantillons ne sont pas envoyés le jour même, ils doivent être conservés au froid avant l'envoi.

Confection du colis : Chaque échantillon est conditionné individuellement dans un emballage hermétique et parfaitement identifié (référence figurant sur la fiche de demande d'analyse). Toutes les mesures doivent être prises pour conserver l'intégrité de l'échantillon et éviter les contaminations par d'autres échantillons. Une signalétique de type « quarantaine » doit figurer sur le colis dans les cas où l'échantillon doit être pris en charge dans des conditions confinées.

Fiche de demande d'analyse : Formulation claire de la demande, marchandise consignée ou non, identification du végétal, de l'expéditeur, référence des échantillons. Cette fiche est fixée à l'extérieur du colis.



7.2 Conservation des échantillons avant analyse

Le délai entre la réception de l'échantillon et le début effectif de l'analyse doit être inférieur à 21 jours. L'échantillon devra pendant ce temps être conservé à 5°C. Les prises d'essai en microtubes peuvent être conservées congelées jusqu'à 3 mois avant analyse.

7.3 Conservation des échantillons ou reliquats après analyse

Sauf mention contraire explicite ou impossibilité technique avérée, les laboratoires doivent conserver les reliquats pertinents (nature, quantité et qualité) de matériel soumis à analyse, dans des conditions appropriées garantissant leur intégrité, au minimum jusqu'au dixième jour ouvrable suivant l'envoi au demandeur d'un rapport d'analyse concluant à la non mise en évidence de l'organisme recherché. Ce délai imposé est destiné à laisser le temps au demandeur de l'analyse de contester le résultat auprès du laboratoire (ce qui prolonge la conservation du reliquat jusqu'à l'issue de la contestation) et éventuellement de demander une analyse contradictoire.

Dans le cas d'un résultat autre que la non mise en évidence de l'organisme recherché, et sauf indications plus précises dans la méthode, l'ensemble des reliquats pertinents doit être conservé pendant une durée minimale de 12 mois, sauf pour les parties éventuellement transmises à un autre laboratoire agréé ou de référence, à qui est alors transférée la charge de conservation des reliquats. Dans le cadre des missions qui lui sont confiées, le laboratoire national de référence peut demander que tout ou une partie de ces reliquats lui soient transmis, aux frais des laboratoires agréés ou reconnus.

8 Mode opératoire

8.1 Préparation des échantillons pour analyse

La préparation des échantillons pour analyse s'effectue sous un poste de sécurité microbiologique.

A partir de l'échantillon reçu au laboratoire, un prélèvement d'environ 1000 graines est effectué de façon aléatoire, à l'aide d'outils de prélèvement préalablement décontaminés par flambage ou à l'hypochlorite de sodium. Ce prélèvement correspondra à l'échantillon pour analyse.

Le poids de mille grains d'un cultivar donné étant fortement dépendant des conditions de sa culture, il n'est pas possible de se baser sur un poids moyen de mille grains a priori pour estimer le nombre de graines. En revanche, il est possible de réaliser un prélèvement de l'équivalent de 1000 grains par pesée en préparant 3 séries de 10 graines, en les pesant, et en multipliant le poids moyen obtenu par 100. Une quantité de graines correspondant à ce poids de mille grains sera prélevée et pesée.

8.2 Broyage des prises d'essai et extraction de l'ADN total

1. Déposer et ouvrir le tube faisant office de témoin négatif d'extraction sur le plan de travail pendant toute la durée de la manipulation des échantillons.
2. Le prélèvement d'environ 1000 graines est placé dans un bol de broyage préalablement décontaminé de taille appropriée.
3. Le prélèvement est broyé pendant environ 1 min à vitesse maximale (14 000 trs/min sur le Mixermill Microtron).



4. Trois prises d'essai d'environ 500 µl de poudre sont transférées à l'aide d'une spatule décontaminée dans un microtube stérile de 2 ml. S'aider des graduations volumétriques présentes sur chaque tube pour ajuster la quantité prélevée. Les deux premières prises d'essai « a » et « b » seront utilisées pour la suite de l'analyse, tandis que la troisième « s » sera conservée congelée en cas de nécessité de confirmation des cas positifs par le laboratoire de référence.
5. Ajouter le volume de tampon de lyse préconisé par le fabricant de kit d'extraction d'ADN dans chaque tube de prise d'essai. Si un dosage au spectrophotomètre est prévu, il sera parfois nécessaire à cette étape d'ajouter la RNase, enzyme qui dégrade les molécules d'ARN. Le volume à ajouter est celui préconisé par le fabricant (fournie avec le kit d'extraction).
6. Incuber chaque tube environ 10 min à environ 65°C (ou à la température recommandée par le fabricant de kit d'extraction d'ADN). Pendant l'incubation, vortexer chaque tube à au moins une reprise pour ré-homogénéiser leur contenu qui aura tendance à sédimenter.
7. À la fin de l'incubation centrifuger les tubes environ 5 min à vitesse maximale. Prélever le surnageant pour poursuivre l'extraction.
8. Le surnageant prélevé est transféré dans un nouveau microtube stérile ou dans la première colonne de filtration du kit d'extraction d'ADN. Le microtube contenant le culot cellulaire est détruit. L'extraction d'ADN se poursuit ensuite en suivant les recommandations du fournisseur du kit d'extraction d'ADN.
9. À la fin du mode opératoire prescrit par le fabricant, l'ADN total est élué dans le volume final de tampon d'éluion recommandé par le fabricant.
10. La solution d'ADN total est diluée au 1/10^e dans une solution du tampon d'éluion fourni ou dans du Tris EDTA 1X. Cette solution d'ADN total constituera la solution (extrait) d'ADN directement analysée par PCR en temps réel (S_{ADN}).

8.3 Test de détection par PCR en temps réel duplex

Préparation et distribution du mélange réactionnel de détection de *P. halstedii*

Le volume réactionnel est 20 µl : 18 µl de mélange réactionnel et 2 µl de S_{ADN} à tester. La composition du mélange réactionnel est la suivante :



Composé	Concentration finale
Eau Ultra Pure	qsp 18 µl
qPCR core kit no ROX (Eurogentec)	
Reaction Buffer	1 X
Chlorure de Magnésium	5 mM
dNTPs mix	4 x 200 µM
DNA Polymerase	0.025 U/µl
Amorce sens QPHAL-F	0.05 µM
Amorce antisens QPHAL-R	0.3 µM
Sonde QPHAL-P	0.05 µM
Amorce sens 18S uni-F	0.3 µM
Amorce antisens 18S uni-R	0.3 µM
Sonde 18S uni-P	0.1 µM

1. Le mix se prépare dans un microtube stérile de 1.5 ou 2 ml.
2. Les différents composants sont décongelés à température ambiante puis homogénéisés par vortexage.
3. Les différents composants sont ajoutés au microtube stérile à l'aide de micropipettes obligatoirement munies de microcônes stériles à embout filtre.
4. Le microtube contenant le mix complet doit être passé au vortex pendant au moins 5 secondes avant sa distribution.
5. Le mix est distribué dans les microtubes de PCR à raison de 18 µl par microtube.

Addition des solutions d'ADN à tester dans les microtubes de PCR

1. Les différentes solutions S_{ADN} correspondant aux différentes prises d'essai sont testées en *duplicata* (2 tubes ou capillaires PCR individuels) à raison de 2 µl par microtube de PCR à l'aide d'une micropipette munie d'un microcône stérile à embout filtre.
2. Les S_{ADN} des différents contrôles sont ajoutés et testées en *duplicata* : T_{-extr} , T_{+LOD} , etc. Pour le T_{-} , on substitue à la S_{ADN} 2 µl d'eau ultra pure. Il est recommandé d'ajouter les témoins positifs en fin de manipulation, après avoir refermé de façon étanche les tubes correspondants aux échantillons à tester.
3. Les microtubes sont transférés dans le bloc ou le rotor du thermocycleur.

Paramètres de l'amplification par PCR en temps réel *P. halstedii*

Les différents paramètres de la PCR en temps réel pour la détection de *P. halstedii* sont les suivants (loos *et al.*, 2012) :



Etape		Température de consigne	Durée programmée	Nombre de cycles
1	Dénaturation initiale et activation de la polymérase à ADN	95 °C *	10 min *	1
2	Dénaturation	95°C	10 sec	40
3	Hybridation - polymérisation	65°C	45 sec puis mesure de la fluorescence FAM et JOE	

* Durée et température à adapter en fonction des recommandations du fournisseur

À la fin de l'amplification par polymérisation en chaîne, les tubes de PCR sont évacués et détruits.

9 Résultats

9.1 Contrôle de la validité des résultats

La validation de l'analyse s'effectue en observant les courbes de fluorescence mesurées par l'appareil de PCR en temps réel et générées à partir des différents témoins.

L'analyse est considérée validée si et seulement si l'ensemble des conditions suivantes est réuni en fin de réaction :

- Aucun des réplicats de T_{-extr} n'a généré de fluorescence « FAM » supérieure à la ligne de seuil déterminée => il n'y a pas eu de contamination croisée accidentelle pendant la phase de broyage et d'extraction d'ADN de la série des échantillons analysés ou pendant la préparation du mélange réactionnel, son dépôt et l'ajout des S_{ADN}.
- Aucun des réplicats de T- (NTC) n'a généré de fluorescence « FAM » supérieure à la ligne de seuil déterminée => il n'y a pas eu de contamination accidentelle pendant la préparation du mélange réactionnel, son dépôt et l'ajout des S_{ADN}.
- Les réplicats de T_{+LOD} ont chacun généré un niveau de fluorescence « FAM » supérieur à la ligne de seuil déterminée => les conditions de PCR et la composition du mélange réactionnel de PCR ont permis d'amplifier spécifiquement et avec une performance optimale la séquence cible chez *P. halstedii*.

Dans le cas où une ou plusieurs conditions ne seraient pas respectées, l'analyse n'est pas validée et selon le type d'anomalie observée, tout ou partie de l'analyse est à refaire.



9.2 Calculs et expression des résultats

Si la série d'analyse est validée, les résultats peuvent être considérés comme interprétables pour l'ensemble des S_{ADN} , donc des prises d'essai et de leur réplicats, testés au cours de la même réaction de PCR.

Pour chacune des réactions de PCR, relever le Ct du contrôle T_{+LOD} ($=Ct_{LOD}$). Tous les extraits d'ADN testés lors de la réaction validée dont le Ct est inférieur à Ct_{LOD} seront considérés comme positifs.

Pour chaque échantillon analysé, les résultats des deux prises d'essai 'A' et 'B' sont interprétés en parallèle. Le statut de l'échantillon est déterminé sur la base des critères suivants :

- Pour qu'un échantillon soit déclaré positif, il suffit qu'au moins une des deux prises d'essai soit positive. Le résultat sera exprimé par une phrase du type « *P. halstedii* détecté dans l'échantillon analysé ».
- Pour qu'un échantillon soit déclaré négatif, il faut que les deux prises d'essai soient négatives. Le résultat sera alors exprimé par une phrase du type « *P. halstedii* non détecté dans l'échantillon analysé ».
- Un échantillon sera déclaré de statut indéterminé si au moins une des deux prises d'essai est de statut indéterminé et l'autre non positive. Le résultat sera alors exprimé par « Résultat indéterminé pour l'échantillon analysé », et il conviendra de mentionner la cause de l'indétermination (présence de composés inhibiteurs ou quantité d'ADN extrait insuffisante).

L'interprétation détaillée en fonction des résultats de chaque duplicata des prises d'essai « A » et « B » est présentée en annexe 1 (tables décisionnelles).



10 Caractéristiques de performance de la méthode

Critère de performance	Résultats obtenus
Caractéristiques de la réaction de PCR en temps réel	<p>L'efficacité de réaction a été évaluée à 1.20 en réaction monoplex, et à 0.87 en réaction duplex. Néanmoins, le seuil de détection de la cible n'est pas affecté par la réaction en duplex d'un point de vue qualitatif lorsque l'on teste des solutions plasmidiques calibrées, car la limite de détection reste la même. En revanche, d'un point de vue quantitatif, un décalage moyen d'environ 3 cycles est obtenu à la limite de détection.</p> <p>Il a été au final démontré que la valeur moyenne de Ct obtenue à partir d'extraits d'ADN de semences de tournesol contaminées (n=72) n'était pas significativement différente entre un test monoplex qPhal et un test duplex qPHAL+18S uni (F=1.02 ; P=0.320)</p> <p>Le R2 calculé pour la réaction monoplex dans un diluant d'eau ultra pure est de 0.99.</p>
Sensibilité analytique	<p>La sensibilité analytique a été estimée en utilisant le Core kit No ROX (Eurogentec)</p> <p>La concentration correspondant à la limite de détection (plus faible concentration produisant 100% de résultats positifs) a été fixée à :</p> <ul style="list-style-type: none">• 45.6 copies plasmidiques d'ADN cible par tube de PCR pour une réaction monoplex qPhal avec dilution dans de l'eau ultrapure.• 456 copies plasmidiques d'ADN cible par tube de PCR pour une réaction duplex qPhal+18S uni avec dilution dans un extrait d'ADN de semences de tournesol.
Spécificité analytique	<p>La spécificité analytique a été évaluée sur une gamme appropriée de différentes espèces de l'ordre des Peronosporales, génétiquement proches de la cible (21 espèces, 24 isolats) et d'espèces de champignons isolées de semences de tournesol (13 espèces, 13 isolats), en utilisant le Core kit No ROX (Eurogentec)</p> <p>Lors de cette caractérisation le test a été 100% spécifique.</p>
Inclusivité	<p>L'inclusivité du test PCR en temps réel a été démontrée in silico par blast sur la base de données GenBank et in vitro sur une gamme représentative de races de <i>P. halstedii</i> de différentes provenances géographiques (51 souches, 12 races, 2 pays) en utilisant le Core kit No ROX (Eurogentec).</p> <p>Lors de cette caractérisation le test a été 100% inclusif.</p>



Répétabilité et reproductibilité	La répétabilité et la reproductibilité ont été évaluées sur 10 réplicats d'une solution plasmidique calibrée dosée à 3 concentrations proches de la limite de détection et sur 10 réplicats d'ADN extrait d'un échantillon de semence de <i>H. annuus</i> naturellement contaminé, en utilisant le Core kit No ROX (Eurogentec). Les résultats sont présentés dans le tableau ci-dessous :					
	Cible	concentration (en copies plasmidiques)	CV (%)		résultat qualitatif	
			répétabilité	reproductibilité	répétabilité	reproductibilité
	Solution plasmidique	2,28 10 ⁴	0.45	2.21	+	+
		2,28 10 ³	0.52	1.52	+	+
2,28 10 ^{2a}		1.98	1.69	+	+	
Echantillon	nd	1.74	4.04	+	+	
<p>^a Concentration égale à 10x la limite de détection du test.</p> <p>Les résultats qualitatifs sont 100% positifs. Les coefficients de variations sont tous inférieurs à 10%. Le test est répétable et reproductible.</p>						
Robustesse	La robustesse du test a été évaluée d'une part en faisant varier le volume d'ADN matrice et le volume réactionnel de ± 10 % et en testant 12 réplicats d'une solution plasmidique calibrée, en utilisant le Core kit No ROX (Eurogentec). Et d'autre part en faisant varier la température d'hybridation et en testant 12 réplicats d'une solution plasmidique calibrée, en utilisant le Core kit No ROX (Eurogentec).					
	Les résultats sont présentés dans le tableau ci-dessous :					
	Paramètres	Ct moyen (±SD) [§]			résultat qualitatif	
	Volume de mix réactionnel	18 µL	20 µL	22 µL	+	
		28.81±0.46 ^a	29.22±0.46 ^a	29.22±0.59 ^a		
Volume d'ADN matrice	1.8 µL	2.0 µL	2.2 µL	+		
	29.70±0.59 ^a	29.52±0.43 ^a	29.53±0.50 ^a			
Temperature d'hybridation	62°C	65°C	67°C	+		
	29.59±0.42 ^a	29.94±0.54 ^a	32.16±0.36 ^b			
<p>[§] les valeurs suivies de la même lettre ne sont pas statistiquement différentes selon le test de Fisher.</p> <p>La variation de ±10% des volumes d'ADN matrice ou de mix réactionnel n'a pas d'effet statistique sur la valeur moyenne de Ct, ni sur le résultat qualitatif. La variation de -3°C de température d'hybridation /polymérisation n'a pas d'effet statistique sur la valeur moyenne de Ct, ni sur le résultat qualitatif. En revanche, la variation de +2°C augmente significativement la valeur moyenne de Ct (+2.24 cycles). Néanmoins elle n'affecte pas le résultat qualitatif (cible toujours détectée). Le test reste robuste, avec 100% de résultats positifs.</p>						



Annexe 1 : Tables décisionnelles

	Type résultat	Prise d'essai A	Prise d'essai B	Action	Interprétation / démarche à suivre
Test qPhal	1	+/+	+/+	FIN	<i>P. halstedii</i> détecté dans E
	2	+/+	+/-	FIN	<i>P. halstedii</i> détecté dans E
	3	+/+	-/-	FIN	<i>P. halstedii</i> détecté dans E
	4	+/-	+/-	Refaire test qPhal sur S _{ADNA} et S _{ADNB}	Suite au nouveau test qPhal : <ul style="list-style-type: none"> • Si résultat 1, 2, 3 ou 4 obtenu : <i>P. halstedii</i> détecté dans E • Si résultat 5 ou 6 obtenu, procéder à l'interprétation des résultats du test 18S uni sur les prises d'essai A et B
	5	+/-	-/-	Refaire test qPhal sur S _{ADNA} et S _{ADNB}	Suite au nouveau test qPhal : <ul style="list-style-type: none"> • Si résultat 1, 2, 3 ou 4 obtenu : <i>P. halstedii</i> détecté dans E • Si résultat 5 ou 6 obtenu, procéder à l'interprétation des résultats du test 18S uni sur les prises d'essai A et B
	6	-/-	-/-	Procéder à l'interprétation des résultats du test 18S uni sur S _{ADNA} et S _{ADNB}	

	Type résultat	Prise d'essai A	Prise d'essai B	Action	Interprétation / démarche à suivre
Test 18S uni	1	+/+	+/+	FIN	<i>P. halstedii</i> non détecté dans E
	2	+/+	+/-	FIN	<i>P. halstedii</i> non détecté dans E
	3	+/+	-/-	FIN	Résultat indéterminé pour E. Préciser la cause de l'indétermination (quantité d'ADN insuffisante* ou présence d'effet inhibiteur).
	4	+/-	+/-	FIN	
	5	+/-	-/-	FIN	
	6	-/-	-/-	FIN	

*Si l'échantillon le permet, refaire de nouvelles prises d'essai.



Bibliographie

Ioos R, Fourrier C, Iancu G, Gordon TR (2009) Sensitive Detection of *Fusarium circinatum* in Pine Seed by Combining an Enrichment Procedure with a Real-Time Polymerase Chain Reaction Using Dual-Labeled Probe Chemistry. *Phytopathology* 99: 582-590.

Ioos R, Fourrier C, Wilson V, Webb K, Schereffer J-L & de Labrouhe DT, 2012 An Optimized Duplex Real-Time PCR Tool for Sensitive Detection of the Quarantine Oomycete *Plasmopara halstedii* in Sunflower Seeds. *Phytopathology* 102, 908-917.