

Méthode d'analyse en santé des végétaux

RÉFÉRENCE : ANSES/LSV/MA 046 - Version 1

Juin 2018

Détection de *Xanthomonas vasicola* pv. *musacearum* sur Bananier par PCR conventionnelle

Laboratoire de la Santé des Végétaux

Laboratoire national de référence « Bactéries sur bananier, agrumes et plantes tropicales »



Historique de la méthode

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

Une modification est qualifiée de majeure lorsqu'elle concerne le processus analytique, le domaine d'application ou des points critiques de la méthode, dont la prise en compte peut modifier les performances de la méthode d'analyse et/ou les résultats. Une modification majeure induit des adaptations. La méthode ainsi modifiée a fait l'objet d'une nouvelle validation, totale ou partielle.

Une modification est qualifiée de mineure si elle apporte des précisions utiles ou pratiques, reformule les propos pour les rendre plus clairs ou plus précis, rectifie des erreurs bénignes. Une modification mineure est sans influence sur les performances de la méthode et ne requiert pas une nouvelle validation.

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

Version	Nature des modifications (majeure/mineure)	Date	Principales modifications
v1*	Sans objet	Juin 2018	Version initiale

* La version 1 a fait l'objet d'une consultation du 04 décembre 2017 au 04 janvier 2018 sur le site internet de l'agence, notamment auprès des laboratoires agréés français.



Avant-propos

La présente méthode a été développée par :

Anses - Laboratoire de la Santé des Végétaux, Unité Ravageurs et agents pathogènes tropicaux.

Laboratoire National de Référence (LNR) pour la détection des bactéries sur plantes tropicales.

Adresse : 7 chemin de l'Irat, Ligne Paradis, 97410 Saint Pierre, Ile de la Réunion.

Contact : saint-pierre.lsv@anses.fr

Les travaux méthodologiques effectués sur la méthode ont donné lieu à un rapport de validation (10/10/2016). Le rapport de validation, ainsi que la méthode ont été revus par des pairs scientifiques, ainsi que l'unité de coordination de la référence du LSV.



Sommaire

Avant-propos	3
Introduction	6
Avertissements et précautions de sécurité	7
1. Objet et domaine d'application	8
2. Documents de référence	8
3. Termes, sigles et définitions	8
4. Principe de la méthode	9
5. Réactifs	10
5.1 Eau.....	10
5.2 Réactifs de biologie moléculaire	10
5.2.1 Kit d'extraction d'ADN	10
5.2.2 Master mix	11
5.2.3 Oligonucléotides	11
5.3 Tampons	11
5.4 Milieux de culture.....	11
5.5 Autres réactifs et consommables.....	11
5.6 Contrôles et témoins.....	12
5.6.1 Pour la détection <i>in planta</i> par PCR conventionnelle	12
5.6.2 Pour la détection <i>in planta</i> par isolement.....	13
5.6.3 Pour la détection sur souche par PCR conventionnelle	13
6. Appareillage et matériels	13
6.1 Broyeur.....	14
6.2 Thermocycleur pour PCR point final	14
7. Échantillons	14
7.1 Conditions d'acceptation des échantillons	14
7.2 Conservation des échantillons avant analyse	15
7.3 Conservation des échantillons ou reliquats après analyse	15
8. Mode opératoire	16
8.1 Préparation des échantillons pour analyse	16
8.2 Broyage de l'échantillon.....	17



8.3 Analyse de l'échantillon	17
8.4 Test spécifique de détection in planta par simplex PCR conventionnelle GspDm	17
8.4.1 Extraction d'ADN.....	17
8.4.2 Simplex PCR spécifique conventionnelle GspDm	18
8.4.3 Electrophorèse et révélation.....	18
8.5 Test d'isolement clé sur milieu gélosé	19
8.5.1 Isolement	19
8.5.2 Incubation	19
8.5.3 Lecture.....	19
8.5.4 Repiquage pour identification.....	19
8.6 Test spécifique d'identification des souches isolées par simplex PCR conventionnelle GspDm.....	20
8.6.1 Préparation de l'échantillon	20
8.6.2 Amplification, électrophorèse et révélation	20
9. Résultats	20
9.1 Contrôle de la validité des résultats	20
9.1.1 Détection in planta par simplex PCR conventionnelle GspDm	20
9.1.2 Détection in planta par test d'isolement clé sur milieu gélosé.....	20
9.1.3 Identification sur souches par simplex PCR conventionnelle GspDm	21
9.2 Calculs et expression des résultats	21
9.2.1 Détection in planta par simplex PCR conventionnelle GspDm	21
9.2.2 Détection in planta par test d'isolement clé sur milieu gélosé.....	21
9.2.3 Identification sur souches par simplex PCR conventionnelle GspDm.....	22
9.2.4 Interprétation finale	22
10. Caractéristiques de performance de la méthode.....	24
Annexe 1 - Recette des tampons et milieux utilisés pour la détection de Xvm	25
Bibliographie.....	26



Introduction

Xanthomonas vasicola pv. *musacearum* (Xvm) est un des agents bactériens responsables du flétrissement du bananier (*Musa* sp.) et des ensete (*Ensete ventricosum*). Il provoque un jaunissement et un flétrissement des feuilles et une maturation prématurée et la pourriture des fruits. Des poches d'exsudats bactériens peuvent être visibles en coupant la tige ou pseudotrunc. Les symptômes sur ensete peuvent être un peu différents. Toutes les feuilles peuvent se flétrir causant la mort de toute la plante.

A la date de publication de la présente méthode, Xvm ne figure pas sur les listes de l'OEPP, ni dans la réglementation européenne, mais représente un danger pour les productions bananières. Il s'agit d'un organisme nuisible potentiellement dangereux pour les territoires des DOM et TOM. Selon l'arrêté préfectoral N° 2011 – 1479 du 30 septembre 2011 modifié, Xvm est réglementé dans l'île de La Réunion.

Xvm est originaire de l'Afrique de l'Est et sa répartition en 2015 montre que cet organisme est pour le moment limité à ces régions.

Les données obtenues sur sa comparaison avec d'autres bactéries du genre *Xanthomonas* (caractérisation moléculaire et tests de pathogénicité) suggèrent que cet organisme soit reclassé sous le nom *Xanthomonas vasicola* pv. *musacearum* ; et non plus sous celui de *Xanthomonas campestris* pv. *musacearum*.



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 exécutés par du personnel ayant reçu une formation appropriée.

Certains réactifs utilisés dans cette méthode peuvent présenter un risque pour l'utilisateur et/ou l'environnement, l'utilisateur doit impérativement suivre les recommandations du fournisseur pour l'utilisation de ces produits et l'élimination des déchets.

Par ailleurs, l'utilisateur de la présente méthode doit mettre en œuvre toutes les mesures nécessaires pour garantir la non-dissémination de l'organisme nuisible dans l'environnement. Ainsi, tout fragment de matériel végétal infecté (ou de statut indéterminé/suspicion) et isolat bactérien en résultant doivent être détruits par autoclavage ou autre moyen inactivant les bactéries.

Les consommables ayant été en contact avec le matériel végétal infecté (ou de statut indéterminé/suspicion) et les isolats bactériens en résultant doivent être détruits par autoclavage ou autre moyen inactivant les bactéries. Le matériel ayant été en contact avec le végétal infecté (ou de statut indéterminé/suspicion) et les isolats bactériens en résultant doit être désinfecté.



1. Objet et domaine d'application

Objet :

L'objet de cette méthode est de détecter la présence de *Xanthomonas vasicola* pv. *musacearum* à partir d'échantillon de bananier asymptomatique ou présentant des symptômes de flétrissement bactérien.

Elle s'appuie sur la combinaison de différents tests :

1. Isolement sur milieu gélosé semi-sélectif YTSA-CC
2. Détection par PCR conventionnelle sur extraits d'ADN issus de broyat de plante, d'exsudat ou sur souches pures

Domaine d'application :

Un test en PCR conventionnelle utilisant un couple d'amorces dont la combinaison est spécifique de *Xanthomonas vasicola* pv. *musacearum* est proposé dans cette méthode.

La méthode s'applique sur des échantillons symptomatiques ou asymptomatiques frais de tissus végétaux de bananier (cœur du pseudotronc). Un échantillon individuel découpé pour un poids frais de 2,0 g sera utilisé pour l'analyse et représentera la prise d'essai.

La prise d'essais peut être aussi effectuée sur l'exsudat bactérien, qui serait éventuellement présent pour des échantillons symptomatiques.

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.
- [2] **MOA GLO 001** : Glossaire des termes techniques en vigueur au Laboratoire de la santé des végétaux
- [3] **Rapport de validation (10/10/2016)** : rapport de caractérisation et de validation de la méthode de détection de *Xanthomonas vasicola* pv. *musacearum* sur parties végétatives de Musaceae.

3. Termes, sigles et définitions

Les termes employés dans la méthode sont issus des normes, guides ou glossaires nationaux ou internationaux appropriés (AFNOR, ISO, CIPV, OEPP...).

Le glossaire MOA 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.

Les sigles sont explicités au fur et à mesure du texte.

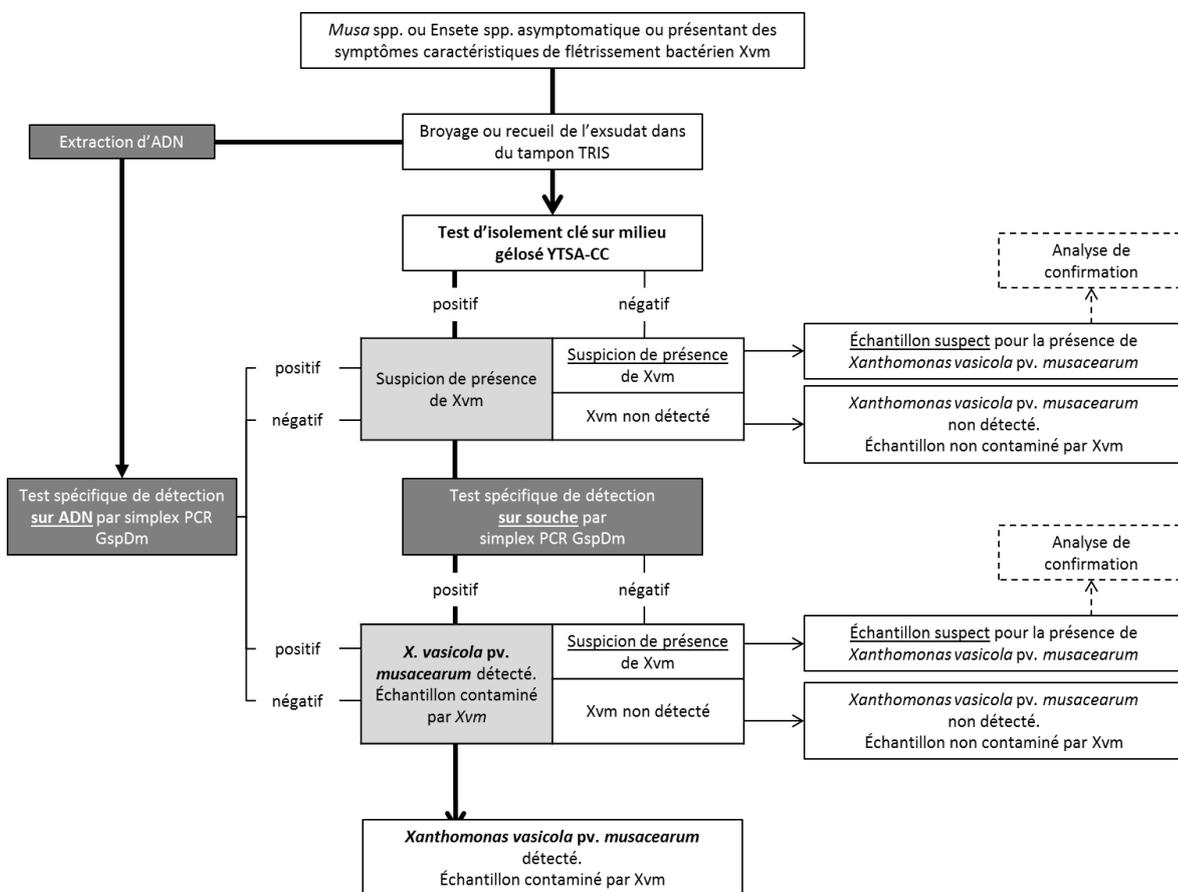


4. Principe de la méthode

Les tests composant la méthode présentée dans ce document sont qualitatifs, c'est à dire qu'ils donnent un résultat du type « positif » ou « négatif ». Un résultat positif indique la présence ou la suspicion de présence de l'organisme cible dans une quantité d'échantillon donnée et dans la limite du seuil de détection de la technique employée.

Un résultat négatif indique l'absence de l'organisme cible dans une quantité d'échantillon donnée et dans la limite du seuil de détection de la technique employée.

Ces tests s'intègrent dans le schéma suivant de détection et d'identification des souches de Xvm :



Détection et identification de Xvm

Les laboratoires mettant en œuvre la détection de Xvm doivent réaliser simultanément deux tests de détection :

- PCR conventionnelle à partir du broyat végétal ou de l'exsudat ;
- Isolement à partir du même broyat végétal ou de l'exsudat + PCR conventionnelle sur souches isolées.



Confirmation de Xvm

L'analyse de confirmation est réalisée de préférence à partir du reliquat de la prise d'essai, à défaut à partir des autres reliquats pertinents. La présence de Xvm est confirmée uniquement si *a minima* le test d'isolement suivi du test d'identification réalisés à partir des souches isolées sont positifs. Dans le cas où le test de biologie moléculaire appliqué sur extrait végétal est positif, mais que le test d'isolement est négatif, la suspicion de présence est confirmée, il est toutefois précisé que la bactérie-cible n'a pas pu être isolée. Dans tous les autres cas, la présence de Xvm n'est pas confirmée.

5. Réactifs

Avertissement : Des appellations commerciales ou fournisseurs peuvent être mentionnées dans le descriptif des produits nécessaires à la mise en œuvre de la présente méthode. Ces informations sont données à l'intention des utilisateurs de la méthode et ne signifient 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.

En règle générale, l'utilisateur 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 interférer 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 optimales.

5.1 Eau

L'eau utilisée pour la préparation des tampons, ainsi que pour les étapes de préparation des échantillons doit être de qualité « analytique » (*i.e.* déminéralisée, distillée, osmosée...) garantissant d'atteindre les critères de performance attendus pour les tests.

L'eau utilisée pour les étapes de PCR (préparation des mix, dilution des amplifiâts) doit présenter une qualité suffisante pour une utilisation en biologie moléculaire (eau ultrapure).

5.2 Réactifs de biologie moléculaire

Certains réactifs sont critiques et conditionnent la performance des étapes d'extraction et d'amplification (kit d'extraction d'ADN, mastermix ou core kit commercial de polymérase thermostable, dNTP, amorces, sondes).

Ces réactifs doivent être utilisés et, pour certains, contrôlés conformément à la méthode d'analyse MOA 022.

5.2.1 Kit d'extraction d'ADN

La présente méthode a été caractérisée et validée en extrayant et purifiant l'ADN total de l'échantillon à l'aide du kit DNeasy® Plant mini kit de Qiagen, en suivant le protocole d'extraction « Plant Tissue » du fournisseur, en commençant par l'étape décrite dans le manuel: « Déposer 400µl de tampon AP1 et 4µl de RNase A dans chaque tube... ».



5.2.2 Master mix

Les tests de PCR conventionnelle ont été validés avec le mélange réactionnel du kit Gotaq® G2 Hot Start Polymerase (Promega). Les validations ont été réalisées avec le tampon de master mix contenant le tampon de charge. Dans ce kit, le tampon est disponible soit avec le tampon de charge déjà mélangé, soit sans le tampon de charge.

5.2.3 Oligonucléotides

Amorces utilisées dans l'amplification moléculaire spécifique par PCR conventionnelle pour Xvm selon Adriko et al. 2012.

Amorces	Séquence	Taille de l'amplicon (pb)
GspDm-F2	GCGGTTACAACACCGTTCAAT	265
GspDm-R3	AGGTGGAGTTGATCGGAATG	

Les amorces, sous forme concentrée ou diluée, sont conservées et manipulées en évitant une trop longue période en phase décongelée. Éviter de trop fréquents cycles de congélation/décongélation, par exemple en préparant des parties aliquotes à nombre d'utilisations limité.

5.3 Tampons

La liste des tampons nécessaires à la mise en œuvre de la méthode est la suivante :

- Tampon de broyage Tris 10 mM (recette disponible en Annexe 1) ;
- Tampons d'extraction (par exemple : ceux du DNeasy® Plant mini kit de Qiagen) ;
- Tampon de migration (par exemple : TAE ou TBE) ;

Tampon de charge (si celui-ci n'est pas intégré au tampon du master mix cf. §5.2).

5.4 Milieux de culture

Milieux de culture semi-sélectif YTSA-CC (recette disponible en Annexe 1) ;

Milieux de culture non sélectif LPGA (recette disponible en Annexe 1).

5.5 Autres réactifs et consommables

Consommables à usage unique

- Microcônes stériles à filtre de volumes adaptés ;
- Microtubes stériles de volume adapté ;
- Microtubes, barrettes ou plaques stériles pour PCR de volume adapté au thermocycleur utilisé.

Anses stériles.

Éthanol 70° (et éventuellement un produit détergent désinfectant de type Aniospray) : désinfection des surfaces de travail et du matériel lors des étapes de prise d'essai, de broyage et d'isolement.

Produits de décontamination de type DNA Away : désinfection des surfaces de travail et du matériel lors de la mise en œuvre des tests de biologie moléculaire.



5.6 Contrôles et témoins

La technique de détection de régions cibles d'ADN d'un organisme par la technique de PCR conventionnelle requiert 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 à l'aide des 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) ;
- il n'y a pas eu de contamination accidentelle des échantillons testés.

5.6.1 Pour la détection *in planta* par PCR conventionnelle

- un **témoin négatif de processus** (TS) : matrice ne contenant pas l'organisme cible, traitée dans les mêmes conditions que les échantillons à analyser, déclarée non contaminée à l'issue de la manipulation (cœur du pseudotruncs de bananier non infectés).
- un **témoin positif de processus** (T+) : matrice contenant l'organisme cible, traitée dans les mêmes conditions que les échantillons à analyser, déclarée contaminée à l'issue de la manipulation (cœur du pseudotruncs de bananier infectés). Il donne au minimum l'assurance d'un déroulement correct de la manipulation. Pour chaque série d'analyses, on peut soit utiliser un échantillon de référence naturellement contaminé ou un échantillon artificiellement contaminé par dopage avec une souche Xvm de référence.
- un **témoin négatif de PCR** (A- ou Teau) : il contient tous les éléments du mélange réactionnel mais aucun extrait d'ADN n'est ajouté, uniquement de l'eau ; cela permet de vérifier l'absence de contamination au cours de la réaction de PCR.
- un **témoin positif de PCR** (A+) en limite de détection (il s'agit d'un témoin de PCR contenant la séquence d'ADN cible en quantité proche du seuil de détection). Ce témoin n'est pas obligatoire mais est conseillé en complément du témoin positif de processus à concentration bactérienne élevée. Son usage permettra de détecter de petites anomalies de déroulement du test, susceptibles d'entraîner la non-détection d'échantillons faiblement infectés. Ce témoin est choisi par le laboratoire parmi les échantillons ayant fourni, lors d'études préalables, des résultats suffisamment constants. Il peut s'agir de témoins positifs produits en interne (suspension bactérienne de référence à une concentration déterminée, solution d'ADN cible à une concentration déterminée) ou de témoins commerciaux utilisés à une dilution appropriée, lorsqu'ils existent et sont disponibles.

Les témoins de processus doivent faire l'objet de deux puits PCR. Les témoins de PCR peuvent faire l'objet d'un puits unique.

D'autres contrôles peuvent être ajoutés si nécessaire et sont définis par la méthode MOA 022.

D'autres souches ou ADN issus de collections internationales ou isolés par le laboratoire, préalablement vérifiés en test moléculaire peuvent également être utilisés comme témoins de référence.



La manipulation de ces témoins positifs doit s'effectuer de manière séparée dans l'espace et/ou dans le temps de façon à éviter toute contamination accidentelle des échantillons.

5.6.2 Pour la détection *in planta* par isolement

Il est conseillé d'utiliser *a minima* comme témoins de processus pour l'isolement, les deux témoins de processus utilisés pour les tests PCR (le témoin négatif de processus et le témoin positif de processus). Ces témoins doivent être isolés dans les mêmes conditions que les échantillons à analyser.

5.6.3 Pour la détection sur souche par PCR conventionnelle

Conformément aux exigences de la méthode d'analyse MOA 022, les témoins à intégrer dans le test de PCR conventionnelle pour l'identification sur souches isolées sont les suivants :

- un **témoin négatif de processus** (TS) : suspension ne contenant pas l'organisme cible (donc constituée uniquement de l'eau de qualité analytique stérilisée), traitée dans les mêmes conditions que les suspensions bactériennes à analyser, déclarée non contaminée à l'issue de la manipulation.
- un **témoin positif de processus** (T+) : suspension bactérienne réalisée à partir d'une souche Xvm de référence, traitée dans les mêmes conditions que les suspensions bactériennes à analyser, déclarée contaminée à l'issue de la manipulation. Ce témoin donne au minimum l'assurance d'un déroulement correct de la manipulation.
- un **témoin négatif de PCR** (A- ou Teau) : il contient tous les éléments du mélange réactionnel mais aucun extrait d'ADN n'est ajouté, uniquement de l'eau ; cela permet de vérifier l'absence de contamination au cours de la réaction de PCR.

Les témoins de processus doivent faire l'objet de deux puits PCR. Les témoins de PCR peuvent faire l'objet d'un puits unique.

D'autres contrôles peuvent être ajoutés si nécessaire et sont définis par la méthode MOA 022.

D'autres souches ou ADN issus de collections internationales ou isolés par le laboratoire, préalablement vérifiés en test moléculaire peuvent également être utilisés comme témoins de référence.

La manipulation de ces témoins positifs doit s'effectuer de manière séparée dans l'espace et/ou dans le temps de façon à éviter toute contamination accidentelle des échantillons.

6. Appareillage et matériels

Avertissement : Des appellations commerciales ou fournisseurs peuvent être mentionnées dans le descriptif des appareils et matériels nécessaires à la mise en œuvre de la présente méthode. Ces informations sont données à l'intention des utilisateurs de la méthode et ne signifient 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.

Pour la mise en œuvre de cette méthode, le laboratoire disposera des appareils décrits dans la méthode officielle d'analyse MOA 022. Différents systèmes peuvent être utilisés, en fonction de l'appareillage disponible au laboratoire.



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 < 10 mL : EMT = $\pm 10\%$ Volume ≥ 10 mL : EMT = $\pm 5\%$
Masse	EMT = $\pm 10\%$
pH	EMT = $\pm 0,3$ unité pH
Température	Incubateur : EMT = $\pm 3^\circ\text{C}$ Réfrigérateur : 5°C et EMT = $\pm 4^\circ\text{C}$ Congélateur : $\leq -18^\circ\text{C}$ Congélateur froid intense : $\leq -65^\circ\text{C}$ Thermocycleur* : EMT justesse = $\pm 1^\circ\text{C}$; EMT homogénéité = $\pm 2^\circ\text{C}$
Temps	EMT = $\pm 10\%$

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

6.1 Broyeur

Cette méthode a été validée en utilisant un broyeur à billes (de type « Homex© » modèle 6 de Bioreba) avec broyage de l'échantillon dans un sachet de broyage en plastique, muni d'une gaze de filtration à mailles en nylon. Le broyat peut alors être récupéré directement dans le sachet. Tout autre système de broyage peut être utilisé, pourvu qu'il permette d'obtenir une qualité de broyage équivalente et limite les risques de contaminations croisées.

6.2 Thermocycleur pour PCR point final

Le protocole a été évalué sur thermocycleur Veriti™ Thermal Cycler de Applied Biosystems et sur GeneAmp® PCR System9700 de Applied Biosystems. D'autres thermocycleurs permettant d'obtenir des résultats équivalents peuvent être utilisés.

7. Échantillons

7.1 Conditions d'acceptation des échantillons

Le laboratoire réalise l'analyse sur exsudat ou sur un broyage de 2,0 g de matériel végétal frais (cœur du pseudotrunc). En dessous de 2,0 g de matériel végétal frais, des réserves sont émises quant au résultat d'analyse si ce dernier est négatif. Les pseudotrons pour analyse doivent arriver au laboratoire dans un état de fraîcheur approprié (turgescents).

Dans le cas contraire, le laboratoire émet des réserves sur tout résultat d'analyse négatif en précisant l'état dégradé de l'échantillon à la réception au laboratoire. Si les échantillons arrivent dans un état trop dégradé, le laboratoire peut refuser l'analyse. Le refus d'analyse doit être motivé et doit être notifié au client dans les plus brefs délais.



7.2 Conservation des échantillons avant analyse

Le délai entre la réception de l'échantillon et le début effectif de l'analyse doit être le plus court possible.

Le délai entre la réception de l'échantillon et le début de l'analyse doit être de préférence inférieur à 3 jours et ne doit pas dépasser 7 jours pour les échantillons frais prélevés dans de bonnes conditions. L'échantillon devra pendant ce temps être conservé à +5°C.

7.3 Conservation des échantillons ou reliquats après analyse

Les laboratoires doivent conserver les reliquats pertinents (nature, quantité et qualité) de matériel soumis à analyse, dans des conditions appropriées garantissant leur intégrité (cf. tableau ci-après), jusqu'à au moins le quinzième jour calendaire suivant l'envoi au demandeur du rapport d'analyse. Dans le cas d'un résultat autre que négatif, ce délai est prolongé à 12 mois pour les reliquats qui le permettent selon les modalités détaillées dans le tableau ci-après.

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 ou une analyse de confirmation.



Étapes	Type de reliquat	Conservation		Modalités d'envoi à un autre laboratoire le cas échéant
		Conditions	Durée	
Prise d'essai	Tiges de bananier ou exsudat bactérien	+5°C	Tout résultat : 15 jours après envoi du rapport	Sachets ou tubes individuels fermés et clairement identifiés Température ambiante Transporteur express avec suivi
Extraction d'ADN	Extraits d'ADN	≤ -18°C	Résultat négatif : 15 jours après envoi du rapport Résultat autre que négatif : 12 mois	Tubes hermétiques clairement identifiés Température ambiante transporteur express avec suivi
Isolements bactériens	Boîtes d'isolement / isolat repiqué	+5°C	Tout résultat : 15 jours après envoi du rapport	Boîtes de culture parafilmées en conditionnement hermétiques et clairement identifiées Température ambiante Transporteur express avec suivi
Identification PCR	Souches bactériennes identifiées positivement, mises en collection	Selon les modalités de mise en collection (exemple : température ambiante pour les lyophilisats ; température ≤ -18°C pour les cryobilles ou les suspensions bactériennes)		Résultat positif : 12 mois Conditionnements hermétiques clairement identifiés Température ambiante Transporteur express avec suivi

8. Mode opératoire

8.1 Préparation des échantillons pour analyse

Deux possibilités se présentent pour la préparation des échantillons. Sachant que les travaux d'Adriko et al. [1] ont montré que la concentration de cellules cible était bien plus importante dans l'exsudat, il est préférable de préparer les échantillons à analyser sur cette matrice. A défaut, les parties végétales peuvent être utilisées.

Les deux cas de figure se présentent sous cette forme :

- Si l'on considère un prélèvement à partir de l'exsudat bactérien provenant de différentes parties de la plante, cet exsudat est collecté (environ 100 µL) et élué dans 400 µL d'eau stérile. L'exsudat peut être récupéré soit de plaies exsudantes, soit à partir du pseudotrunc



coupé en diagonale, soit du fruit préalablement désinfectés en surface et coupés perpendiculairement. Il apparaît généralement 5 à 15min après la section du tissu végétal.

- Si l'on considère un prélèvement à partir de plants de bananier, symptomatique ou asymptomatique, l'opérateur décontamine sa surface à l'aide de papier absorbant imbibé d'alcool à 70°, puis excise et coupe en petits morceaux au scalpel la prise d'essai, qui doit être de 2,0 g.

Entre chaque prise d'essai, l'utilisateur veillera à désinfecter le matériel utilisé pour les prélèvements.

Suite à la prise d'essai, les reliquats de matériel végétal sont conservés selon les modalités indiquées au paragraphe 7.3.

8.2 Broyage de l'échantillon

Broyer le matériel végétal dans 5 mL de TRIS 10 mM pH 7.2 stérile à l'aide d'un broyeur à billes, ou de toute autre méthode de broyage permettant d'obtenir des résultats équivalents.

Remarque : dans le cas d'un prélèvement d'exsudat comme prise d'essai, le broyage n'est pas applicable.

8.3 Analyse de l'échantillon

Faire à partir du broyat végétal obtenu pour chaque échantillon (analyse sur organes végétatifs) ou sur exsudat :

- des isollements sur milieu de culture gélosé semi-sélectif YTSA-CC selon les indications du §8.5.
- une extraction d'ADN : 2 mL (approximativement) du broyat végétal obtenu ou de l'exsudat est transféré dans des tubes de type Eppendorf® pour la réalisation de l'extraction d'ADN telle que décrite au §8.4.1

Remarque : pour des raisons pratiques, le volume nécessaire pour réaliser les isollements (50 µL ou 50 µL x 2 selon le cas) peut être prélevé à partir du volume prélevé pour l'extraction d'ADN.

En étape préalable à l'extraction d'ADN, les tubes sont centrifugés environ 10min à 20 000 g afin de culoter les bactéries, de préférence en conditions réfrigérées (meilleure tenue du culot). Le surnageant est par la suite éliminé.

Ce culot peut être directement extrait, ou bien être conservé à +5°C pendant quelques heures avant l'extraction, ou encore être conservé à une température inférieure ou égale à -18°C pendant plusieurs semaines en attente de l'extraction.

Les reliquats de broyats sont conservés selon les modalités indiquées au paragraphe 7.3.

8.4 Test spécifique de détection in planta par simplex PCR conventionnelle GspDm

Chaque échantillon fait l'objet d'une extraction unique, mais chaque extrait doit être déposé deux fois soit au final 2 puits par échantillon (analyse de détection).

8.4.1 Extraction d'ADN

L'ADN total de l'échantillon contenant l'ADN bactérien est extrait et purifié à l'aide d'un kit commercial. L'élution de l'ADN total est de 100 µL (2 éluions successives de 50 µL chacune). Les



extraits d'ADN peuvent être conservés plusieurs semaines, à une température $\leq -18^{\circ}\text{C}$, en attente de la réalisation de l'amplification.

Après utilisation, les tubes contenant les extraits d'ADN sont conservés selon les modalités décrites au §7.3.

8.4.2 Simplex PCR spécifique conventionnelle GspDm

Établir soigneusement le plan de distribution (plan de plaque) et d'identification des extraits.

Mélange réactionnel :

Réactifs	[Solution Mère] exemple	[Puits]	Volume pour un puits (μl) (pour les concentrations de solutions-mères données)
Eau			14,55
Buffer	5 X	1 X	5
MgCl ₂	25 mM	1,5 mM	1,5
dNTPs	10 mM	0,2 mM	0,5
GspDm-F2	10 μM	0,25 μM	0,625
GspDm-R3	10 μM	0,25 μM	0,625
GoTaq G2 Hot Start	5 U/ μL	1 U	0,2
Total avant Ajout d'ADN			23
ADN			2
Total			25

Programme d'amplification :

	Température ($^{\circ}\text{C}$)	Durée	Cycles
Dénaturation initiale	95	5min	
Dénaturation	95	20s	35
Hybridation	64	15s	
Élongation	72	13s	
Élongation finale	72	10min	
Conservation	4	∞	

8.4.3 Electrophorèse et révélation

Pour chaque amplification, 10 μL de produit de PCR sont déposés sur un gel d'agarose à 1,5% et visualisé après migration. L'électrophorèse et la révélation sont réalisées conformément à la MOA 022.



8.5 Test d'isolement clé sur milieu gélosé

8.5.1 Isolement

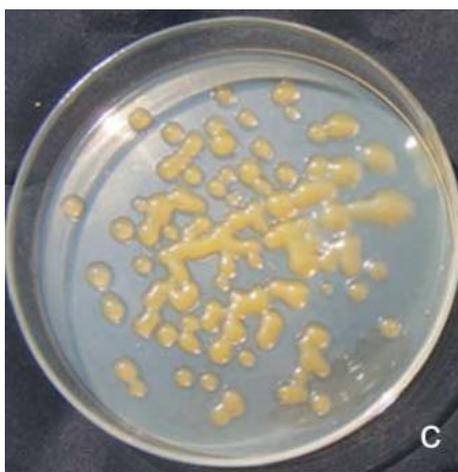
L'isolement se fait à partir d'un volume de dépôt de 50 µL de broyat ou d'exsudat sur milieu gélosé semi-sélectif YTSA-CC. Un étalement en trois-secteurs est réalisé pour isoler une colonie typique de Xvm.

8.5.2 Incubation

Incuber les boîtes de cultureensemencées à +28°C pendant 2 à 3 jours sur milieu YTSA-CC.

8.5.3 Lecture

Observer les boîtes après le temps de croissance indiqué précédemment et repérer les colonies isolées dont la morphologie et la couleur sont typiques des colonies de Xvm : colonies jaunes, rondes, opaques, bombées, muqueuses et à bords réguliers sur milieu semi-sélectif YTSA-CC. La coloration est moins jaune sur milieu non sélectif LPGA, mais les colonies conservent les autres caractéristiques. La couleur jaune est due à la synthèse d'un pigment appelé xanthomonadine, présent chez toutes les espèces de Xanthomonas.



Culture de Xvm sur milieu YTSA (Source : Mwangi et al. 2007)

8.5.4 Repiquage pour identification

Tout échantillon présentant au moins une colonie typique Xvm (ou suspecte) sur au moins une boîte de culture doit faire l'objet d'une identification.

L'identification des colonies typiques Xvm (ou suspectes) se fait à l'aide du test par PCR conventionnelle GspDm.

Pour ce faire, repiquer au moins une colonie typique (ou suspecte) par échantillon sur milieu semi-sélectif YTSA-CC ou sur milieu non sélectif LPGA (Annexe 1). Laisser incuber à +28°C pendant environ 24-48h pour obtenir une culture « fraîche ».

Remarque : *En cas de doute, ne pas hésiter à multiplier le nombre d'isolats à identifier par échantillon.*

Les boîtes d'isolement et les isolats doivent être conservés selon les modalités indiquées au paragraphe 7.3.



8.6 Test spécifique d'identification des souches isolées par simplex PCR conventionnelle GspDm

Le test d'identification par PCR conventionnelle est lié à la méthode d'analyse MOA 022. Il ne peut être appliqué qu'en respectant les préconisations de cette méthode.

Chaque isolat fait l'objet d'une extraction unique et chaque extrait bactérien est déposé une fois, soit 1 puits par isolat à identifier (analyse d'identification).

8.6.1 Préparation de l'échantillon

Une anse de 2 µL de souches isolées sur boîte est suspendue dans 500 µL d'eau de qualité suffisante pour utilisation en biologie moléculaire, puis calibrée à une DO de 0,06 à 650nm, correspondant à une concentration de l'ordre de 10⁷ CFU/mL.

8.6.2 Amplification, électrophorèse et révélation

Pour les conditions d'amplification, d'électrophorèse et de révélation se référer aux indications du §8.4.

9. Résultats

9.1 Contrôle de la validité des résultats

La vérification de la conformité à l'attendu pour les témoins est un préalable à l'interprétation des résultats des échantillons soumis à analyse. Les résultats attendus pour les témoins utilisés dans chaque test sont décrits dans les paragraphes ci-après.

9.1.1 Détection in planta par simplex PCR conventionnelle GspDm

L'analyse par simplex PCR conventionnelle GspDM est validée si les conditions ci-dessous sont vérifiées :

Type de contrôle	Résultats attendus		
	Puits 1	Puits 2	Final
Témoin négatif de processus (TS)	-	-	NÉGATIF
Témoin positif de processus (T+)	+	+	POSITIF
Témoin négatif d'amplification (A- ou Teau)	-	-*	NÉGATIF

* la duplication de ce témoin est facultative.

9.1.2 Détection in planta par test d'isolement clé sur milieu gélosé

Pour valider les résultats d'isolement issus des échantillons, il faut préalablement :

- s'assurer de l'absence de colonies typiques Xvm sur les boîtes d'isolement du témoin négatif de processus ;



- s'assurer de la présence de colonies typiques de Xvm sur les boîtes d'isolement du témoin positif de processus.

9.1.3 Identification sur souches par simplex PCR conventionnelle GspDm

L'analyse par PCR conventionnelle sur souches isolées est validée dans les mêmes conditions que pour la détection *in planta* par PCR conventionnelle.

Type de contrôle	Résultats attendus	
		Final
Témoin négatif de processus (TS)	-	NÉGATIF
Témoin positif de processus (T+)	+	POSITIF
Témoin négatif d'amplification (A- ou Teau)	-	NÉGATIF

9.2 Calculs et expression des résultats

9.2.1 Détection *in planta* par simplex PCR conventionnelle GspDm

Le résultat d'un puits PCR est positif s'il présente une bande à la taille attendue (265 pb).

Le résultat d'un puits PCR est négatif s'il ne présente aucune bande à la taille attendue (265 pb).

Les résultats s'interprètent de la manière suivante :

Analyses		Résultat	Interprétation
Puits 1	Puits 2		
+	+	POSITIF	Test positif
+	-	PCR à refaire <i>si à nouveau au moins 1 positif sur 2, le test est interprété comme positif</i>	
-	-	NÉGATIF	Test négatif

9.2.2 Détection *in planta* par test d'isolement clé sur milieu gélosé

Xvm se caractérise par des colonies jaunes, rondes, opaques, bombées, muqueuses et à bords réguliers sur milieu semi-sélectif YTSA-CC. La coloration est moins jaune sur milieu non sélectif LPGA, mais les colonies conservent les autres caractéristiques.

Les colonies doivent avoir la même morphologie que les colonies obtenues à partir du témoin positif de processus isolé sur le même milieu.



9.2.3 Identification sur souches par simplex PCR conventionnelle GspDm

L'interprétation des résultats se fera de la même manière que pour la détection *in planta* par simplex PCR conventionnelle GspDm (§9.2.1).

9.2.4 Interprétation finale

La détection de Xvm implique la mise en œuvre simultanément de deux tests de détection (Figure 1) :

- PCR conventionnelle à partir du broyat végétal ou de l'exsudat ;
- Isolement à partir du même broyat végétal ou de l'exsudat

		Test par isolement clé sur milieu gélosé	
		POSITIF	NÉGATIF
Test par simplex PCR conventionnelle GspDm sur broyat	POSITIF	Suspicion de présence de Xvm dans l'échantillon	Suspicion de la présence de Xvm dans l'échantillon
	NÉGATIF	Suspicion de présence de Xvm dans l'échantillon	Résultat négatif pour la détection de Xvm

En cas de Suspicion de présence de Xvm dans l'échantillon une PCR conventionnelle GspDm est mise en œuvre sur souches isolées.

		Test par simplex PCR conventionnelle GspDm sur souches	
		POSITIF	NÉGATIF
Test par simplex PCR conventionnelle GspDm sur broyat	POSITIF	Résultat positif pour la détection et l'identification de Xvm	Suspicion de la présence de Xvm dans l'échantillon
	NÉGATIF	Résultat positif pour la détection et l'identification de Xvm	Résultat négatif pour la détection de Xvm

Ainsi la bactérie Xvm est déclarée détectée et identifiée dans les échantillons pour lesquels l'isolement et la détection par la simplex PCR conventionnelle GspDm donnent un résultat positif.

La bactérie Xvm est déclarée non détectée dans les échantillons pour lesquels l'isolement s'avère négatif ou si l'isolement est positif, mais non confirmé par la simplex PCR conventionnelle GspDm.

La formulation des résultats sur le rapport d'analyse se fait de la façon suivante (ou selon une formule équivalente) :



		Test par isolement clé sur milieu gélosé & simplex PCR conventionnelle GspDm sur souches	
		POSITIF	NÉGATIF
Test par simplex PCR conventionnelle GspDm sur broyat	POSITIF	Rapport mentionnant : <i>X. vasicola</i> pv. <i>musacearum</i> déclarée détectée et identifiée	Rapport mentionnant : Suspicion de la présence de <i>X. vasicola</i> pv. <i>musacearum</i> dans l'échantillon, toutefois la bactérie cible n'a pas pu être isolée
	NÉGATIF	Rapport mentionnant : <i>X. vasicola</i> pv. <i>musacearum</i> déclarée détectée et identifiée	Rapport mentionnant : <i>X. vasicola</i> pv. <i>musacearum</i> déclarée non détectée

L'intérêt de combiner les deux tests est le suivant :

- la PCR conventionnelle *in planta* permet un diagnostic rapide et permet en cas de résultat positif de guider la lecture des isolements (potentiellement difficiles à interpréter en présence de saprophytes) ;
- l'isolement + PCR conventionnelle sur souches isolées permet de récupérer sur milieu de culture l'organisme cible et de garantir le résultat de la PCR conventionnelle *in planta*.

Reliquats d'échantillons : voir §7.3.



10. Caractéristiques de performance de la méthode

Caractéristique	Paramètre	Valeur obtenue à l'issue de la caractérisation	Modalités de caractérisation
Sensibilité	Pourcentage d'échantillons détectés parmi les échantillons cibles	100%	13 échantillons cibles testés en triplicat représentatifs de la diversité géographique et génétique
Spécificité	Pourcentage d'échantillons non détectés parmi les échantillons non-cibles	100%	17 échantillons non-cibles testés en triplicat représentatifs de la diversité géographique et génétique
Exactitude	Pourcentage de vrais positifs et de vrais négatifs parmi des échantillons cibles et des échantillons non-cibles	100%	13 échantillons cibles et 17 échantillons non-cibles testés en triplicat
Seuil de détection	Niveau de concentration le plus bas pour lequel tous les résultats (100%) sont positifs	10 ⁴ CFU/mL (ADN) 10 ⁵ CFU/mL (souches)	13 échantillons cibles testés en triplicat testés sur 5 niveaux de concentrations : 10 ⁶ , 10 ⁵ , 10 ⁴ , 10 ³ et 10 ² CFU/mL
Répétabilité	Pourcentage d'accords entre réplicats d'un même échantillon	100%	13 échantillons testés en triplicat



Annexe 1 - Recette des tampons et milieux utilisés pour la détection de Xvm

Tampon TRIS Sigma 7-9 10 mM (pH = 7.2)

La composition du tampon de broyage TRIS Sigma 7-9 pour 1L est la suivante :

Composants	Masse Molaire (g/mol)	Concentration finale	Poids (g)
Tris(hydroxyméthyl)aminométhane $\text{NH}_2\text{C}(\text{CH}_2\text{OH})_3$ [Sigma 7-9]	121,135	10 mM	1,211
		Eau distillée	Qsp 1 L

Étapes de fabrication :

- Peser le TRIS Sigma 7-9 et le mettre en solution dans une le volume final d'eau distillée ;
- Contrôler le pH et ajuster si nécessaire à 7,2 ;
- Autoclaver le tampon ;

Consignes d'utilisation :

N'utilisez le tampon de broyage qu'à température ambiante et le conserver à +5°C pour une durée maximale de 3 mois.

Milieu LPGA (pour 1 L)

LPGA (pH 7.1)	
Levure	1 g
Pastone-Tryptone	11 g
Glycérol	6,3 g
Agar	18 g
Autoclavage et refroidissement	

Milieu YTSA-CC (pour 1 L)

YTSA-CC (pH 7)	
Levure	10 g
Pastone-Tryptone	10 g
Saccharose	10 g
Agar	15 g
Après Autoclavage et refroidissement, ajouter :	
Céphalexine	50 mg
Cycloheximide	150 mg



Bibliographie

1. Adikini S, Tripathi L, Beed F, Tusiime G, Magembe EM, et al. Development of a specific molecular tool for detecting *Xanthomonas campestris* pv. *musacearum*. Plant Pathol. 2011; 60: 443-452.
2. Adriko J, Aritua V, Mortensen CN, Tushemereirwe WK, Kubiriba J, et al. Multiplex PCR for specific and robust detection of *Xanthomonas campestris* pv. *musacearum* in pure culture and infected plant material. Plant Pathol. 2012; 61: 489-497.
3. Tripathi L, Tripathi JN, Tushemereirwe WK, Bandyopadhyay R. Development of a semi-selective medium for isolation of *Xanthomonas campestris* pv. *musacearum* from banana plants. Eur J Plant Pathol. 2007; 117: 177-186.