

Méthode d'analyse en santé des végétaux

RÉFÉRENCE : ANSES/LSV/MA 051 - Version 2

Février 2019

Détection et identification par analyse morphologique et biomoléculaire du nématode du pin *Bursaphelenchus xylophilus*

Laboratoire de la Santé des Végétaux

Laboratoire national de référence « Nématodes phytoparasites sur toutes matrices »



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	Date	Principales modifications
MOA 020 partie B v1a		Septembre 2011	Version initiale (initialement codifiée sous MOA 020 partie B)
	erratum	Octobre 2011	Modification du mélange réactionnel pour la PCR spécifique (XR-XF)
V2*	mineure	Février 2019	<ul style="list-style-type: none">• Mise au format ANSES• § 4 : Ajout dans l'organigramme de l'étape d'identification du genre• § 6 : Ajout des erreurs maximales tolérées (EMT)• § 7.2 : Modification de la consigne de température de conservation des échantillons avant analyse.• Précisions sur les conditions d'incubation• § 8.3 : Ajout du § 8.3.2 « identification du genre »• Ajout de critères de reconnaissance de la famille des Aphelenchoididae et du genre <i>Bursaphelenchus</i>• § 9.1 : Ajout d'un chapitre concernant le contrôle de la validité des résultats d'extraction et d'identification morphologique• § 9.3 : Tableau des résultats finaux complété• Ajout de la gestion des analyses en cas de discordance entre les analyses morphologiques et biomoléculaires• § 10 : Ajout de l'évaluation de la performance de la méthode pour l'identification morphologique et la PCR conventionnelle

*La version 2 a fait l'objet d'une consultation du 04 au 20 mai 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 de Nématologie

Laboratoire National de Référence : Nématodes phytoparasites sur toutes matrices

Adresse : Domaine de la Motte au Vicomte

BP 35327

35653 Le Rheu Cedex

France

Tél : +33(0)2 99 30 48 28

Contact : rennes.lsv@anses.fr



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 Extraction	10
5.2 Identification morphologique.....	10
5.3 Amplification génomique.....	10
6. Appareillage et matériels	11
6.1 Extraction	12
6.1.1 Matériel.....	12
6.1.2 Consommables et petits matériels	12
6.2 Identification morphologique.....	12
6.2.1 Matériel.....	12
6.2.2 Consommables et petits matériels	12
6.3 Identification par amplification génomique	13
6.3.1 Matériel.....	13
6.3.2 Consommables et petits matériels	13
7. Échantillons	13
7.1 Conditions d'acceptation des échantillons	13
7.2 Conservation des échantillons avant analyse	13
7.3 Conservation des échantillons ou reliquats après analyse.....	14
8. Mode opératoire	14
8.1 Préparation des échantillons pour analyse	14
8.2 Extraction des nématodes	14
8.2.1 Migration.....	14
8.2.2 Récupération des nématodes	14



8.2.3 Conditionnement de l'extrait.....	14
8.3 Identification morphologique.....	15
8.3.1 Principe.....	15
8.3.2 Identification du genre.....	15
8.3.3 Identification du groupe.....	16
8.3.4 Identification de l'espèce.....	17
8.3.5 Résultats de l'identification morphologique.....	18
8.4 Identification par amplification génomique.....	18
8.4.1 Prise d'analyse.....	18
8.4.2 Contrôles et témoins.....	18
8.4.3 Extraction d'ADN.....	19
8.4.4 Amplification d'ADN.....	19
8.4.5 Electrophorèse.....	21
8.4.6 Révélation.....	21
9. Résultats.....	22
9.1 Contrôle de la validité des résultats d'extraction et d'identification morphologique.....	22
9.2 Contrôle de la validité des résultats de biologie moléculaire.....	22
9.3 Interprétation et expression des résultats finaux.....	24
10. Caractéristiques de performance de la méthode.....	25
Bibliographie.....	26



Introduction

Le nématode du pin, *Bursaphelenchus xylophilus*, est un parasite inféodé aux conifères et causant la maladie dite « Maladie du dépérissement du pin » (ou « pine wilt disease »). Il se rencontre principalement sur *Pinus*, mais d'autres conifères tels que *Larix*, *Abies*, *Cedrus*, *Chamaecyparis*, *Pseudotsuga* et *Picea* peuvent aussi être hôtes de ce nématode.

Les symptômes visibles causés par la présence de *B. xylophilus* dans l'arbre sont le jaunissement et le flétrissement des aiguilles. Il peut provoquer la mort de l'arbre contaminé dans l'année en bloquant la circulation de la sève dans le tronc.

Cet organisme nuisible est transmis d'un arbre à un autre par un insecte xylophage du genre *Monochamus*. Toutefois, le risque de dissémination à grandes distances le plus important est le transport de bois ou de végétaux contaminés par le nématode, seul ou accompagné de son vecteur.

Ce nématode a été décrit pour la première fois en 1934 en Amérique du Nord. Il n'a jamais causé de dégâts sur ce continent en raison de la résistance naturelle des conifères. Il a ensuite été introduit au Japon puis en Chine, en Corée et à Taïwan. Son éradication n'a jamais été atteinte dans ces pays. Puis en 1999, il a été découvert au Portugal, où l'introduction a sans doute eu lieu peu d'années auparavant. Depuis 2008, plusieurs foyers ont été détectés au Portugal et en Espagne. A la date de la publication de la méthode, *B. xylophilus* n'a jamais été détecté en France sur peuplements.

B. xylophilus est réglementé au sein de l'Union européenne (directive 2000/29/CE).



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.



1. Objet et domaine d'application

Cette méthode décrit les modalités d'extraction du nématode du pin *Bursaphelenchus xylophilus* et son identification par analyse morphologique et biomoléculaire.

Objets susceptibles d'être soumis à analyse

La méthode est applicable aux bois et écorces de conifères sous forme de copeaux ou morceaux de bois.

2. Documents de référence

- [1] MOA 012 - Extraction, détection et identification morphobiométrique des nématodes phytoparasites
- [2] 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] Directive 2000/29/CE du Conseil du 8 mai 2000 - Directive 2000/29/CE du Conseil du 8 mai 2000 concernant les mesures de protection contre l'introduction dans la Communauté d'organismes nuisibles aux végétaux ou aux produits végétaux et contre leur propagation à l'intérieur de la Communauté Journal officiel n° L 169 du 10/07/2000 p. 0001 – 0022
- [4] MOA-GLO 001- Glossaire général et technique en vigueur au LNPV
- [5] MOA-REP 001 : Répertoire des recettes en vigueur au LNPV
- [6] Rapport d'évaluation d'outils moléculaires de détection de *Bursaphelenchus xylophilus* sur extrait de bois. LSV Unité de nématologie, septembre 2014, version 2
- [7] Rapport d'évaluation de la méthode d'identification morphologique de *Bursaphelenchus xylophilus*. LSV Unité de nématologie, mai 2011

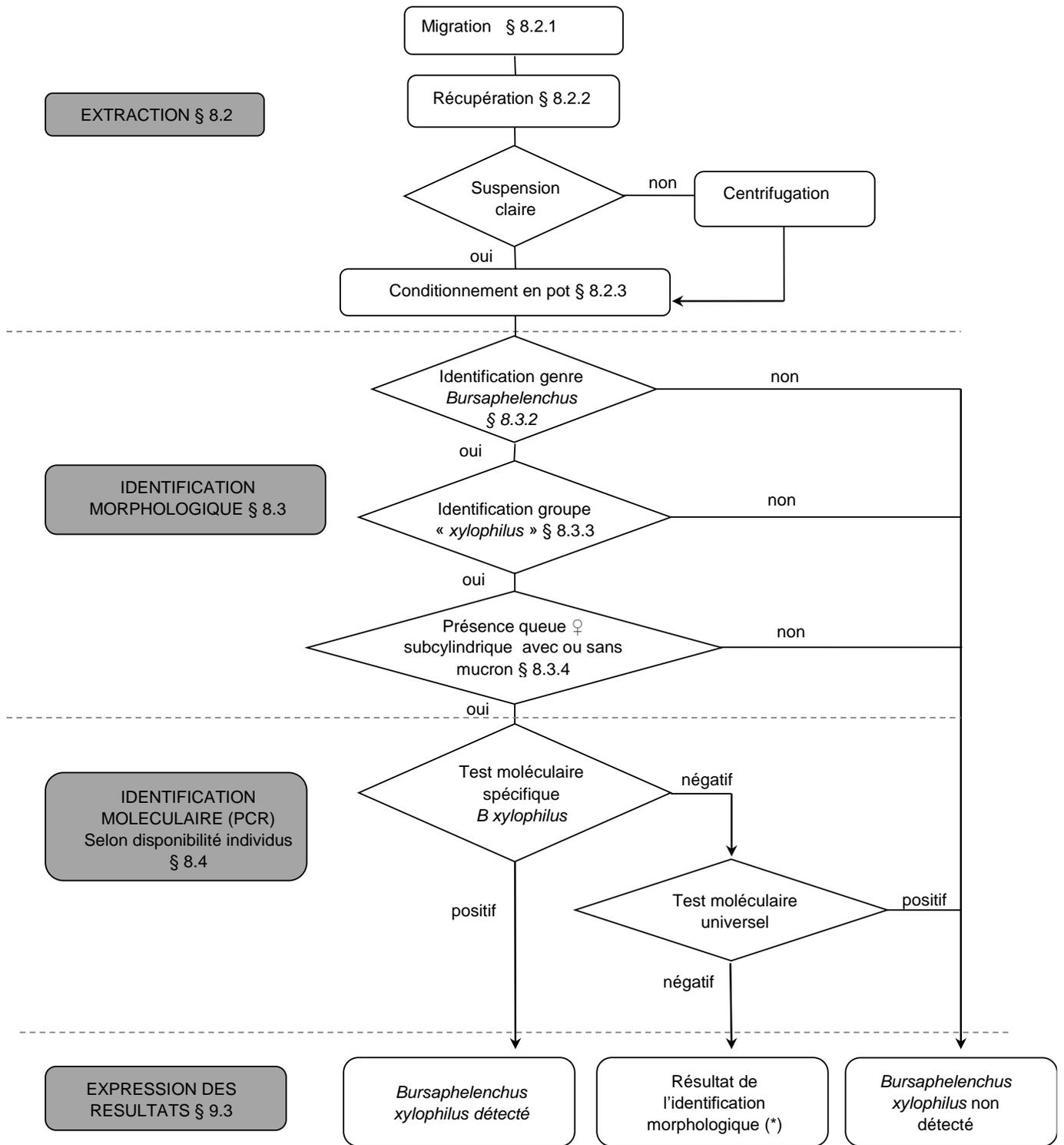
3. Termes, sigles et définitions

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...).



4. Principe de la méthode

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



(*) : Et mention « ADN non exploitable » sur le rapport d'analyse



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.

5.1 Extraction

Eau du robinet

Kaolin

Solution de sulfate de magnésium (densité environ 1,18) ou solution de propriété équivalente (voir chapitre 1.2.1.3. de la MOA 012 ainsi que le répertoire des recettes REP 001).

5.2 Identification morphologique

Eau du robinet

Huile à immersion

5.3 Amplification génomique

En règle générale, le manipulateur doit veiller (par l'utilisation de produits et consommables dits de qualité biologie moléculaire, 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 avec 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 les plus optimales.

- Eau Ultra Pure de qualité biologie moléculaire

-**Tampon d'extraction d'ADN** : Tris HCl 10mM pH=8,0 ; EDTA 1mM ; Nonidet P40 1% ; protéinase K 100µg/mL tampon final (d'après Ibrahim *et al.*, 1994)

- Oligonucléotides

Cible	Amorces	Séquence 5' → 3'
<i>B. xylophilus</i>	XF ⁽¹⁾	ACGATGATGCGATTGGTGAC
	XR ⁽¹⁾	TATTGGTCGCGGAACAAACC
Tous nématodes	Forward primer ⁽²⁾	CGTAACAAGGTAGCTGTAG
	Reverse primer ⁽²⁾	TTTCACTCGCCGTTACTAAGG

(1) Matsunaga & Togashi (2004).

(2) Burgermeister *et al.* (2005)

Remarque : Les amorces spécifiques *B. xylophilus* (XF et XR) peuvent être utilisées en duplex avec des amorces spécifiques *B. mucronatus* décrites dans Matsunaga & Togashi (2004).



- Pré-mix commercial

Des mélanges réactionnels prêts à l'emploi commercialisés par plusieurs fournisseurs et contenant certains réactifs nécessaires à la réalisation de master mix de PCR (tampon de polymérase, polymérase à ADN, dNTP, $MgCl_2$, etc.) peuvent être utilisés.

- ADN polymérase thermostable et tampon de polymérase

N'importe quelle polymérase à ADN peut être utilisée dès lors que les résultats obtenus sont au moins équivalents à ceux obtenus avec la Taq MP Biomedical (ref. EPTQD925) lors de l'évaluation de la méthode. Dans ce cas, le tampon de polymérase utilisé sera celui commercialisé par le fournisseur de la polymérase à ADN associée.

Ces réactifs peuvent être déjà compris dans un pré-mix commercial.

- Chlorure de magnésium ($MgCl_2$)

Ce réactif peut être, dans certains cas, déjà intégré dans un pré-mix commercial.

- Désoxyribonucléotides triphosphates (dNTPs)

Les quatre désoxyribonucléotides triphosphates (dATP, dCTP, dGTP, dTTP) peuvent être déjà intégrés dans un pré-mix commercial.

- Autres réactifs

Tampon de charge

Marqueur de taille moléculaire

Agarose

Tampon d'électrophorèse : Tris Acétate EDTA (TAE) ou Tris Borate EDTA (TBE)

Marqueur d'acides nucléiques : bromure d'éthidium, SYBR Safe ou autres intercalants de l'ADN

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.

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 = $\pm 10\%$
Température	réfrigérateur : 5°C et EMT = $\pm 4^\circ\text{C}$ (ou plus strict en fonction des recommandations fournisseur) congélateur : $\leq -10^\circ\text{C}$ ou $\leq -18^\circ\text{C}$ en fonction des recommandations fournisseur thermocycleur* : EMT justesse = $\pm 1^\circ\text{C}$; EMT homogénéité = $\pm 2^\circ\text{C}$ enceinte climatique : 25°C et EMT = $\pm 4^\circ\text{C}$

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

6.1 Extraction

6.1.1 Matériel

Centrifugeuse à rotor libre avec bols de grande capacité à fond hémisphérique

Incubateur à 25°C environ

6.1.2 Consommables et petits matériels

Filtre papier ou en cellulose

Cuvettes ou autres récipients de capacité adaptée

Tamis de migration ou autre support de mailles supérieures à 40 μm (passoire par exemple)

Cuillère, spatule, système d'homogénéisation (fouet, vibreur...)

Pissette d'eau du robinet et pissette de sulfate de magnésium

Tamis de récupération (mailles d'environ 20 μm au plus)

Récipients pour conditionnement des extraits

Le maillage des tamis spécifié dans la présente méthode ne fait pas l'objet d'exigences métrologiques. Il convient cependant de s'assurer du bon état des tamis de récupération.

6.2 Identification morphologique

6.2.1 Matériel

Microscope stéréoscopique (loupe binoculaire) avec éclairage épiscopique et diascopique, grossissement de l'ordre de 16 à 60X.

Microscope photonique haute définition (grossissements de l'ordre de X16 à X1000).

6.2.2 Consommables et petits matériels

Cil monté sur aiguille ou autre instrument adapté pour la manipulation des nématodes

Cellule de lecture

Pissette

Lames et lamelles couvre objets

Vernis



6.3 Identification par amplification génomique

6.3.1 Matériel

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.

En plus de l'appareillage courant d'un laboratoire de biologie moléculaire (pipettes, centrifugeuses, agitateur, bain-marie, cuves d'électrophorèse, système de prise de vue de gel d'électrophorèse...), le matériel suivant est jugé nécessaire pour certaines phases de l'analyse :

- Broyeur de tissu oscillant pour microtubes d'environ 2 mL (par exemple Tissulyser, Qiagen®) ou matériel équivalent
- Appareil de PCR conventionnelle.

6.3.2 Consommables et petits matériels

Embouts de pipette avec et sans filtre de volume adapté,

Billes de verre de 1 mm et 3 mm de diamètre.

Microtubes d'environ 2 mL,

Microtubes, capillaires ou plaques pour PCR adaptés au thermocycleur.

7. Échantillons

7.1 Conditions d'acceptation des échantillons

Limitations relatives aux objets susceptibles d'être soumis à analyse

La taille et le volume des échantillons à prélever pour la recherche de *B. xylophilus* doivent permettre une mise en migration optimale avec le matériel standard d'un laboratoire et limiter les risques de dissémination liés aux vecteurs.

Précautions particulières à prendre

Le laboratoire doit mettre en place une procédure adaptée à son environnement (locaux, infrastructures, équipements...) visant à éviter tout risque de confusion entre échantillons et de contamination d'un échantillon par un autre.

7.2 Conservation des échantillons avant analyse

Il est recommandé de réaliser une incubation préalable, notamment pour permettre une multiplication des nématodes éventuellement présents et augmenter la capacité de détection. Pour ce faire, les échantillons sont mis à incuber dans un sac en plastique fermé et si besoin légèrement humidifiés à l'aide d'un pulvérisateur à main (cas de bois très sec). Ils sont maintenus à une température d'environ 25 °C, à l'aide d'un incubateur par exemple, pendant une période minimale de 15 jours à partir de la date de réception (Schröder *et al*, 2009).

S'il s'agit d'échantillons de bois d'importation, de bois d'emballage ou de calage, l'incubation n'est pas nécessaire.



Les extraits obtenus après extraction du bois peuvent être conservés quelques jours au froid positif en attendant leur analyse.

7.3 Conservation des échantillons ou reliquats après analyse

Pendant l'analyse, les reliquats d'échantillons sont à conserver dans les mêmes conditions qu'avant analyse (§ 7.2) et ce jusqu'à la fin de l'analyse.

Il n'y a pas d'exigences particulières concernant la conservation des reliquats de matériels utilisés sauf spécifications contraires de la Direction générale de l'Alimentation au sein du Ministère chargé de l'agriculture

8. Mode opératoire

8.1 Préparation des échantillons pour analyse

Grandeur de l'objet soumis à l'analyse.

Utiliser la totalité ou une partie de l'échantillon de bois reçu (quantité déterminée par le protocole de prélèvement) avec un volume maximal de 400 mL pour les copeaux et une taille maximale de 3cm x 3cm x 5cm pour les disques, écorces et les morceaux de bois.

Dans le cas où le volume de l'échantillon dépasse 400 mL, homogénéiser et prélever environ 400 mL.

8.2 Extraction des nématodes

8.2.1 Migration

L'échantillon de bois est placé dans un tamis qui repose dans une cuvette remplie d'eau. Les nématodes vont migrer à travers les mailles du tamis vers l'eau. Un papier filtre est intercalé entre l'échantillon et le tamis (méthode décrite *chapitre 1.2.2.2 de la MOA012*).

Laisser les nématodes migrer pendant au moins 24 heures à température ambiante.

8.2.2 Récupération des nématodes

Enlever le tamis et filtrer l'eau de la cuvette sur un tamis de récupération.

Si la suspension obtenue est sale, procéder à une centrifugation de l'extrait obtenu au sulfate de magnésium (Voir principe et description de la centrifugation *chapitre 1.2.1.3 de la MOA12*) :

- Transférer la suspension dans un bol de centrifugation à l'aide d'un jet de pissette de sulfate de magnésium de densité 1,18.
- Ajouter une cuillerée de kaolin et homogénéiser.
- Centrifuger 2 min à 900 g (durée et accélération approximatives).
- Récupérer les nématodes par filtration du surnageant sur un tamis de 20 µm.

8.2.3 Conditionnement de l'extrait

Transférer le contenu du tamis de récupération dans un récipient de lecture à l'aide d'une pissette d'eau. L'extrait est conservé au froid positif.



8.3 Identification morphologique

8.3.1 Principe

Cette identification nécessite la connaissance des principaux genres de nématodes phytoparasites.

Dans un premier temps, l'analyse consiste à sélectionner à la loupe binoculaire, les nématodes pouvant appartenir à la famille des Aphelenchoididae.

Les individus conservés sont ensuite préparés pour une observation au microscope. Les nématodes appartenant au genre *Bursaphelenchus* et au groupe *xylophilus* sont ensuite caractérisés à l'aide de la clé d'identification de l'espèce.

8.3.2 Identification du genre

- Observer directement l'extrait dans le récipient de conditionnement ou dans une coupelle de lecture au microscope stéréoscopique.

Rechercher et sélectionner les nématodes appartenant à la famille des **Aphelenchoididae** caractérisée par les critères suivants : corps fin, pas de dimorphisme sexuel, recouvrement oblique de l'intestin par la glande digestive, vulve postérieure, stylet court et fin, boutons basaux étroits parfois inexistant, bulbe médian (metacorpus) très volumineux, spicules robustes chez les mâles.

- Préparer, si cela est possible, 5 mâles et 5 femelles de la population sélectionnée pour une observation au microscope photonique à fort grossissement (*MOA012 chapitre 1.3.2.1*).

Vérifier l'appartenance des individus à la famille des Aphelenchoididae: sortie de la glande dorsale oesophagienne située au niveau du metacorpus (et non, comme pour les Tylenchidae, au niveau du procorpus derrière les boutons basaux).

Rechercher les nématodes appartenant au **genre *Bursaphelenchus*** caractérisé par les critères suivants: présence de petits boutons basaux, extrémité de la queue du mâle fortement recourbée et présentant une petite bursa (Fig.3).

- Cas particulier : l'identification spécifique par morphologique des larves est impossible, seule l'identification du genre est réalisable. Les larves font donc l'objet d'une identification moléculaire lorsque les critères suivants sont observés : tête offset, bulbe médian très volumineux et extrémité de la queue sub-cylindrique, avec extrémité arrondie sans mucron. En l'absence d'adulte et d'identification plus poussée, la détection du genre fera mention : ***Bursaphelenchus* sp détecté**.

Si aucun individu du genre *Bursaphelenchus* n'est observé, l'analyse est terminée et le résultat est formulé comme indiqué § 8.3.5. Dans le cas contraire, passer à l'étape suivante.



8.3.3 Identification du groupe

L'identification de l'appartenance au **groupe « *xylophilus* »** nécessite, au minimum, l'observation correcte au microscope photonique d'un mâle et d'une femelle de la population à déterminer.

Les espèces du groupe « *xylophilus* » sont caractérisées par :

- 4 lignes latérales (Fig.1)
- un fort recouvrement vulvaire chez la femelle (Fig.2)
- de grands spicules fortement arqués chez le mâle (Fig.3)



Fig.1

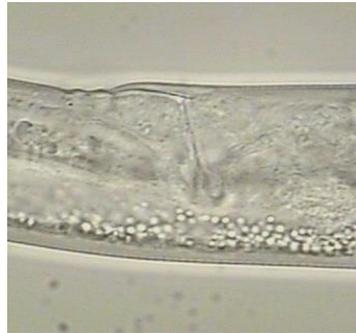


Fig.2



Fig.3

Les critères «recouvrement vulvaire» et «grands spicules fortement arqués» doivent impérativement être observés pour pouvoir statuer sur le groupe. Parfois, le recouvrement vulvaire ne peut être observé sur des femelles mal positionnées (par exemple sur le dos), c'est pourquoi il est préconisé de préparer plusieurs individus de chaque sexe.

Si toutefois un des deux critères n'est pas observé, l'étape suivante est mise en œuvre.

Si pour un individu, au moins un des critères observés est différent de ceux indiqués (par exemple observation de 6 lignes latérales ou absence de recouvrement vulvaire), celui-ci n'appartient pas au groupe « *xylophilus* ».



8.3.4 Identification de l'espèce

Les individus identifiés comme appartenant au groupe "xylophilus" sont observés au microscope photonique.

L'identification de l'espèce *Bursaphelenchus xylophilus* nécessite, au minimum, l'observation d'une femelle de la population à déterminer:

1	Femelle avec queue conique ou effilée avec ou sans mucron (Fig.4-5-6).....	pas <i>B. xylophilus</i>
	Femelle avec queue sub-cylindrique (Fig.7).....	2
2	Femelle avec queue sub-cylindrique, avec extrémité arrondie sans mucron (Fig.7)...	<i>B. xylophilus</i>
	Femelle avec queue sub-cylindrique avec un mucron terminal (Fig.8).....	pas <i>B. xylophilus</i> ou <i>B. xylophilus</i> mucroné (forme rare)



Fig.4



Fig 5



Fig 6



Fig.7



Fig.8



8.3.5 Résultats de l'identification morphologique

L'identification morphologique conduit à l'un des résultats suivants :

1- *Bursaphelenchus xylophilus* détecté.

Lorsqu'au moins une des femelles observées est identifiée comme appartenant à l'espèce.

2- *Bursaphelenchus xylophilus* non détecté.

Lorsque aucun des individus observés n'a pu être identifié comme appartenant au groupe *xylophilus*, ou aucune des femelles observées comme appartenant à l'espèce *B. xylophilus*.

3- *Bursaphelenchus* « groupe *xylophilus* » détecté non classé (ni 1 ni 2)

Lorsqu'au moins une des femelles observées est du groupe *xylophilus* et présente une queue subcylindrique mucronée.

Les résultats 1 et 3 (*Bursaphelenchus* groupe *xylophilus* avec queue de la femelle subcylindrique) donnent lieu à la mise en œuvre d'une identification moléculaire, si le nombre d'individus est suffisant. Sinon seule l'identification morphologique est réalisée. Pour l'expression du résultat final, se reporter au § 9.3

Le résultat 2 conduit à la fin de l'analyse. Pour l'expression du résultat final, se reporter au § 9.3

Cas particulier : en cas de présence uniquement de larves ayant les caractéristiques de l'espèce *B. xylophilus* (cas particulier du paragraphe 8.3.2), le résultat sera : *Bursaphelenchus* sp (larves type *B. xylophilus*) détecté.

8.4 Identification par amplification génomique

8.4.1 Prise d'analyse

L'analyse est réalisée sur des nématodes isolés qui auront été prélevés et conditionnés préalablement en microtubes avec 100 µl de tampon d'extraction ADN. Le nombre de nématodes par microtube doit être compris entre 3 et 10 individus. En dessous de 3 individus analysés, des réserves sont émises si un résultat négatif est obtenu.

La prise d'analyse est alors soit soumise à extraction d'ADN, soit conservée au froid négatif jusqu'à l'extraction d'ADN.

8.4.2 Contrôles et témoins

Des échantillons de référence doivent être inclus en cours de processus analytique pour valider les différentes étapes de la méthode. Les contrôles à produire au cours de l'analyse sont au minimum les suivants :

- un contrôle négatif de processus (E-) : tampon d'extraction ADN seul conditionné selon les mêmes modalités que celles pour l'échantillon à analyser,



- un témoin positif de PCR (A+) : il contient tous les éléments du mélange réactionnel, ainsi qu'un extrait d'ADN de *B. xylophilus* ; ce témoin permet de vérifier que la réaction de PCR s'est déroulée de façon correcte et a permis une amplification des échantillons contenant la cible,
- un témoin négatif de PCR (A-) : il contient tous les éléments du mélange réactionnel mais aucun extrait d'ADN n'est ajouté ; cela permet de vérifier l'absence de contamination au cours de la réaction de PCR.

8.4.3 Extraction d'ADN

L'extraction d'ADN résulte de l'action successive d'un broyage mécanique (billes de verre) et d'un traitement chimique (protéinase K).

Pour ce faire,

- Ajouter des billes de verre de diamètre différent (2 billes de 3 mm et quelques billes de 1 mm) au tube de conditionnement contenant les nématodes.
- Placer sous agitation pendant environ 40 secondes à fréquence maximale (tubes préalablement décongelés).
- Placer les tubes au bain marie (entre 50 et 60°C) pendant au moins une heure, pour permettre l'activation de la protéinase K.
- Centrifuger les tubes pour précipiter les débris cellulaires.
- Transférer le surnageant dans un nouveau tube ou en microplaque pour un nouveau traitement thermique à environ 95°C pendant environ 10 min (dénaturation de la protéinase K). Il est conseillé de réaliser cette étape en thermocycleur pour garantir une meilleure performance thermique de cette étape.

8.4.4 Amplification d'ADN

Pour chaque extrait d'ADN, un minimum de 2 tubes de réaction par PCR doit être réalisé pour la recherche de *B. xylophilus* dans l'échantillon.

Test PCR spécifique

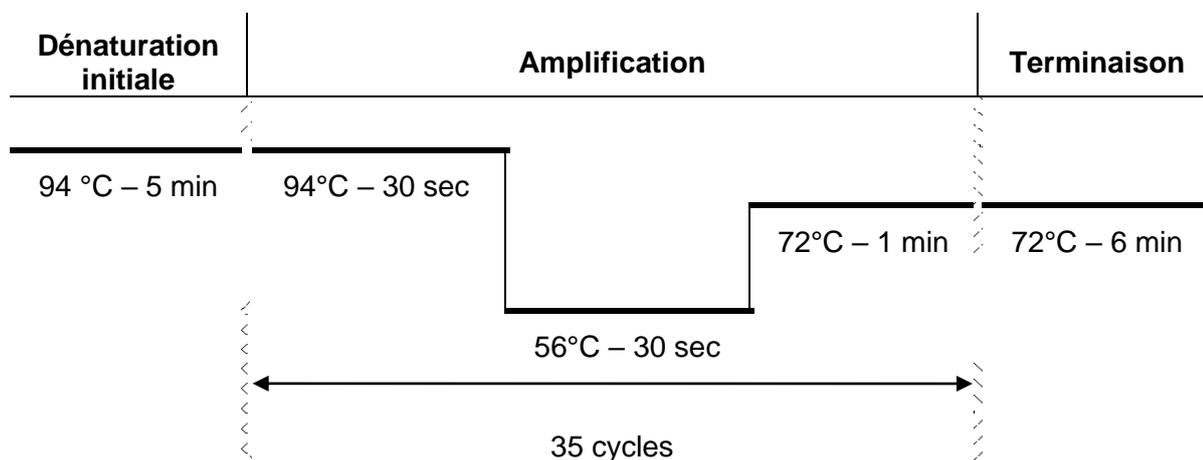
L'amplification d'ADN est réalisée dans les conditions suivantes :

Réactifs		Concentration finale par tube de réaction	
Volume réactionnel total		20 µl	
Tampon Taq DNA polymérase		1 X	
MgCl ₂ (prendre en compte le MgCl ₂ éventuellement présent dans le tampon Taq)		1.5 mM	
Amorce XF		0.2 µM	
Amorce XR		0.2 µM	
dNTPs		0.2 mM	
Taq DNA polymérase 5U/µl		0,5 U/réaction	
Eau ultra pure		Qsp 20 µl	
Ajouter	5 µl ADN	à	20 µl du mélange réactionnel



L'évaluation de ce test PCR a été réalisée avec une Taq DNA polymérase de MP Biomedicals (réf. EPTQD925).

Appliquer le cycle d'amplification suivant :



Test PCR universelle

L'amplification d'ADN est réalisée dans les conditions suivantes :

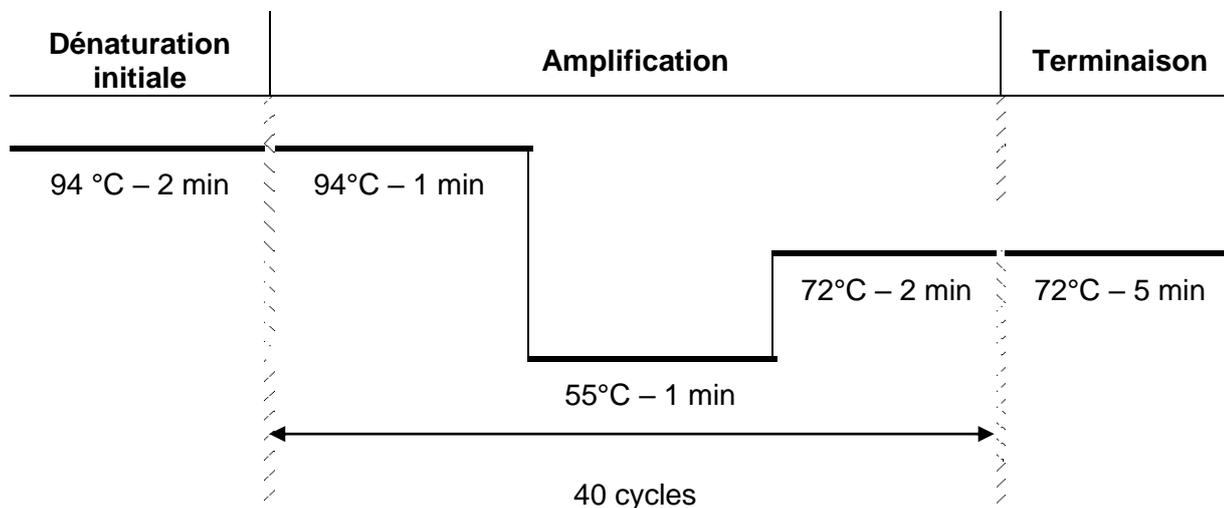
Réactifs	Concentration finale par tube de réaction
Volume réactionnel total	20 µl
Tampon Taq DNA polymérase	1 X
MgCl ₂ (prendre en compte le MgCl ₂ éventuellement présent dans le tampon Taq)	2 mM
Amorce Forward	0.6 µM
Amorce Reverse	0.6 µM
dNTPs	0.1 mM
Taq DNA polymérase	2U/réaction
Eau ultra pure	Qsp 20 µl

Ajouter 5 µl ADN à 20 µl du mélange réactionnel

L'évaluation de ce test PCR a été réalisée avec une Taq DNA polymérase de MP Biomedicals (réf. EPTQD925).



Appliquer le cycle d'amplification suivant :



8.4.5 Electrophorèse

Préparer un gel d'agarose dans un tampon TAE ou TBE (voir MOA-REP 001). Le marqueur d'ADN (intercalant) peut soit être ajouté dans le gel lors de sa préparation, soit ultérieurement.

Une échelle de poids moléculaire, dont l'intervalle encadre la taille des fragments attendus, doit être déposée sur chaque ligne de dépôts afin de définir la taille du fragment obtenu.

Faire migrer les produits d'amplification en appliquant un courant électrique.

8.4.6 Révélation

La révélation se fait directement par lecture sur table UV si le marqueur d'ADN a été préalablement incorporé (§ 8.4.5).

Sinon, la révélation est réalisée après immersion dans une solution de marqueur d'ADN (le bromure d'ethidium, BET, est souvent utilisé comme marqueur à la concentration de 1 µg/mL). Cette solution doit être protégée de la lumière ; après coloration, rincer si nécessaire le gel à l'eau (sans chlore).

Observer le gel sous UV.

Remarques : veiller à la protection des utilisateurs contre les UV (yeux, peau) et le BET ou tout autre marqueur d'ADN par le port obligatoire de gants nitrile. Tous les déchets ayant été en contact avec du BET ou tout marqueur d'ADN doivent être éliminés selon une procédure adaptée à ces déchets toxiques.

D'autres marqueurs de l'ADN sont également disponibles (e. g. SybrGreen, lecture à 530 nm).



9. Résultats

9.1 Contrôle de la validité des résultats d'extraction et d'identification morphologique

Des contrôles périodiques sont réalisés pour s'assurer du maintien de la fiabilité du dispositif d'analyse et de la compétence des opérateurs. Les contrôles peuvent prendre la forme de participation à des essais inter laboratoires d'aptitude ou d'autocontrôles organisés par le laboratoire.

9.2 Contrôle de la validité des résultats de biologie moléculaire

Des échantillons de référence doivent être inclus en cours de processus analytique pour valider les différentes étapes de la méthode. Les contrôles à produire au cours de l'analyse sont au minimum ceux listés au § 8.4.2.

Ces contrôles permettent de vérifier le bon fonctionnement des étapes d'extraction d'ADN et de PCR (amplification de l'ADN de *B. xylophilus* pour le contrôle positif et absence de contamination pour les contrôles négatifs).

L'analyse pour la PCR spécifique ou la PCR universelle est validée si les conditions ci-dessous sont vérifiées :

Type de contrôle	Résultat attendu et devant être observé
Contrôle négatif de processus (E-)	NEGATIF
Contrôle négatif de PCR (A-)	NEGATIF
Contrôle positif de PCR (A+)	POSITIF

L'analyse est qualitative. Quel que soit le test PCR, le résultat du test par puits est négatif pour les échantillons ne présentant aucune amplification à la taille attendue. Le résultat du test par puits est positif pour les échantillons présentant un fragment de taille attendue.



Cas de la PCR spécifique : Les amorces XF et XR décrites au § 5.3 permettent une amplification spécifique d'un fragment d'environ 560 pb pour *B. xylophilus*.

Analyse		Résultat du test	Résultat de l'analyse moléculaire
Puits 1	Puits 2		
+	+	POSITIF	Résultat positif pour l'identification moléculaire de <i>Bursaphelenchus xylophilus</i>
+	-	PCR à refaire. Si au moins 1 positif sur 2 lors de la 2 ^{ème} amplification, le résultat est interprété comme positif.	
-	-	NEGATIF, test PCR universelle à réaliser	

Remarque : + et - correspondent respectivement à la présence et à l'absence du fragment d'amplification à la taille attendue.

Cas de la PCR universelle (Burgermeister *et al.*, 2005) : Les amorces Forward et Reverse décrites au § 5.3 permettent une amplification spécifique d'un fragment de taille entre 850 à 1350 pb selon l'espèce de *Bursaphelenchus*.

Analyse		Résultat du test	Résultat de l'analyse moléculaire
Puits 1	Puits 2		
+	+	POSITIF	Présence d'ADN amplifiable, <i>Bursaphelenchus xylophilus</i> non identifié
+	-	POSITIF	Présence d'ADN amplifiable, <i>Bursaphelenchus xylophilus</i> non identifié
-	-	NEGATIF	ADN non amplifiable, pas de résultat d'identification moléculaire



9.3 Interprétation et expression des résultats finaux

Le résultat final de détection de *B. xylophilus* est exprimé sous forme qualitative et résulte de la combinaison des résultats d'identification morphologique et moléculaire, lorsque les deux types d'identification ont été mis en œuvre, selon les règles de décisions suivantes :

		Identification morphologique			
		<i>B. xylophilus</i> non détecté	<i>B. xylophilus</i> détecté	<i>B. groupe xylophilus</i> non classé (queue ♀ subcylindrique mucronée)	<i>Bursaphelenchus sp</i> (larves type <i>B. xylophilus</i>) Cas particulier § 8.3.2
Identification moléculaire	Pas d'identification moléculaire réalisée	<i>B. xylophilus</i> non détecté	<i>B. xylophilus</i> détecté	<i>B. xylophilus</i> non détecté ³	
	<i>B. xylophilus</i> identifié		<i>B. xylophilus</i> détecté	<i>B. xylophilus</i> détecté	<i>B. xylophilus</i> détecté
	<i>B. xylophilus</i> non identifié		<i>B. xylophilus</i> détecté ¹	<i>B. xylophilus</i> non détecté	<i>B. xylophilus</i> non détecté
ADN non exploitable			<i>B. xylophilus</i> détecté ^{1, 2}	<i>B. xylophilus</i> non détecté ²	<i>B. xylophilus</i> non détecté ^{2, 4}

L'expression du résultat d'analyse sur le rapport est une phrase semblable à :

***Bursaphelenchus xylophilus* non détecté**

***Bursaphelenchus xylophilus* détecté**

Remarques :

¹ : Dans le cas où les résultats morphologiques sont non concordants avec les résultats de biologie moléculaire, ou si aucune amplification n'est obtenue (absence d'ADN amplifiable), de nouveaux individus (si reliquat) sont analysés en morphologie et biologie moléculaire. Si les résultats sont de nouveau discordants, seuls les résultats des analyses de morphologie sont pris en compte (*B. xylophilus* détecté).

² : Un commentaire sera porté sur le rapport indiquant que l'analyse moléculaire n'a pu être réalisée pour cause d'ADN non exploitable.

³ : Un commentaire sera porté sur le rapport indiquant : *Bursaphelenchus sp. du groupe xylophilus* détecté.

⁴ : Un commentaire sera porté sur le rapport indiquant : *Bursaphelenchus sp.* détecté.



10. Caractéristiques de performance de la méthode

La synthèse des caractéristiques de performance de la méthode présentée ci-après est extraite du « rapport de validation de l'identification morphologique de la méthode d'analyse MOA020 partie B » établi par le LNR (version de mai 2011) pour la partie morphologie et les caractéristiques de performance des outils d'identification de *B. xylophilus* par PCR conventionnelle sur individus isolés sont extraits du rapport « Evaluation d'outils moléculaires d'identification de *Bursaphelenchus xylophilus* sur individus isolés » (version 2, septembre 2014).

Tableau récapitulatif des critères de performance obtenus en morphologie :

Critères de performance	clé du groupe	clé des espèces
Seuil de détection	1 ♂ et 1 ♀	1 ♀
Spécificité	100%	100%
Sensibilité	100%	100%
Reproductibilité	100%	100%
Facilité d'interprétation des résultats	+	-
Facilité de mise en œuvre au sein d'autres laboratoires	-	-

Cette méthode nécessite une forte expérience en identification morphobiométrique. En effet, la difficulté d'observation de certains critères a été mise en évidence à différentes étapes de l'évaluation.

Synthèse des résultats de l'évaluation d'outils d'identification de *B. xylophilus* par PCR conventionnelle

Critères de performance	Matsunaga & Togashi (2004)
Seuil de détection	5 individus
Répétabilité du test PCR *	100%
Reproductibilité du test PCR *	100%
Spécificité relative	100%
Sensibilité relative	100%
Exactitude relative	100%
Facilité d'interprétation des résultats	+
Facilité de mise en œuvre au sein d'autres laboratoires	+

+ : avantage par rapport aux autres outils,
 - : inconvénients par rapport aux autres outils,
 * : au seuil de détection

Pour la partie identification par outils moléculaires, le seuil de détection est globalement de 5 individus pour atteindre une répétabilité et une reproductibilité de l'essai de 100%. La spécificité des tests est de 100%.



Bibliographie

- BURGERMEISTER W., METGE K., BRAASCH H. et E. BUCHBACH (2005) ITS-RFLP patterns for differentiation of 26 *Bursaphelenchus* species (Nematoda: Parasitaphelenchidae) and observations on their distribution. *Russian Journal of Nematology*, 13(1), 29-42.
 - Castagnone C., Abad P. & P. Castagnone-Sereno (2005) Satellite DNA-based species-specific identification of individuals of the pinewood nematode *Bursaphelenchus xylophilus* (Nematoda: Aphelenchoididae). *European Journal of Plant Pathology*, 112, 191-193.
 - FRANCOIS C., CASTAGNONE C., BOONHAM N., TOMLINSON J., LAWSON R., HOCKLAND S., QUILL J., VIEIRA P., MOTA M., CASTAGNONE-SERENO P. (2007) Satellite DNA as a target for TaqMan real-time PCR detection of the pinewood nematode, *Bursaphelenchus xylophilus*. *Molecular plant pathology* 8(6), 803-809.
 - IBRAHIM S.K., PERRY R.N., BURROWS P.R. et HOOPER D.J. (1994) Differentiation of species and populations of *Aphelenchoides* and of *Ditylenchus angustus* using a fragment of ribosomal DNA. *Journal of nematology*, 26, 412-421.
 - MATSUNAGA K. et K. TOGASHI (2004) A simple method for discriminating *Bursaphelenchus xylophilus* and *B. mucronatus* by species-specific polymerase chain reaction. *Nematology*, 6(2), 273-277.
- SCHRÖDER T., McNAMARA D., GAAR V. (2009) Guidance on sampling to detect pine wood nematode *Bursaphelenchus xylophilus* in trees, wood and insects. *Bulletin OEPP* (39),2, 179-188