

Méthode d'analyse en santé des végétaux

RÉFÉRENCE : ANSES/LSV/MA053- Version 1

Mars 2018

Détection de *Fusarium circinatum* sur scolytes par PCR en temps réel



Laboratoire de la santé des végétaux

Laboratoire national de référence « Champignons sur toute matrice »



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
MOA003 partie D		Janvier 2015	Version initiale
v1	majeures	Mars 2018	<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• Mise à jour de la dénomination scientifique de l'organisme cible (<i>Fusarium circinatum</i>) selon les nouvelles règles nomenclaturales en mycologie Changement du seuil de positivité d'un réplicat de PCR pour la cible

* La version 1 a fait l'objet d'une consultation du 29 décembre 2017 au 09 février 2018 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 version de la méthode a été rédigée en se basant sur les résultats d'un projet de recherche mené par le Laboratoire de la Santé des Végétaux (unité de mycologie, Nancy) visant à mettre au point une technique moléculaire de détection du champignon *Fusarium circinatum* sur scolytes.

La présente méthode a été mise au point, optimisée, caractérisée et évaluée par l'unité de mycologie du LSV. Ce projet s'appuie sur un précédent travail méthodologique visant à détecter ce champignon sur semences de pins (Ioos et al., 2009).

Le travail de relecture a été effectué par l'unité « 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	8
4. Principe de la méthode	9
5. Réactifs	10
5.1 Eau.....	10
5.2 Kits d'extraction d'ADN de plante.....	10
5.3 Oligonucléotides	10
5.4 Kit de PCR en temps-réel	10
5.5 Autres consommables à usage unique	11
5.6 Contrôles et témoins.....	11
6 Appareillage et matériels	12
7 Échantillons	13
7.1 Conditions d'acceptation des échantillons	13
7.2 Conservation des échantillons avant analyse	14
7.3 Conservation des échantillons ou reliquats après analyse.....	14
8 Mode opératoire	14
8.1 Préparation des échantillons pour analyse	14
8.2 Broyage des prises d'essai et extraction d'ADN total	15
8.3 Test de détection par PCR en temps réel.....	15
9 Résultats	17
9.1 Contrôle de la validité des résultats	17
9.2 Calculs et expression des résultats	17
10 Caractéristiques de performance de la méthode	18
Annexe 1 Tables décisionnelles	20
Bibliographie	22



Introduction

Fusarium circinatum Nirenberg & O'Donnell (ex *Gibberella circinata* Nirenberg & O'Donnell ; Syn *F. subglutinans* [Wollenweb and Reinking] Nelson, Toussoun and Marasas f. sp. *pini*) est un important agent pathogène des *Pinus* spp. et de *Pseudotsuga menziesii* qui cause des chancres résineux sur arbres adultes et pourritures racinaires ou mortalité chez les jeunes semis. Les graines et les jeunes plants infectés de *Pinus* spp. et de *Pseudotsuga menziesii* peuvent véhiculer le champignon pathogène de régions infectées vers des régions saines. Des insectes de type « scolyte » peuvent par ailleurs faire office de vecteur en transportant des conidies sur leur exosquelette ou dans leur système digestif, d'arbres infectés vers des arbres sains.



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.

L'exigence de confinement pour la manipulation de formes viables de cet agent pathogène à dissémination aérienne doit être de type NS3.

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 mélange réactionnel 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 *F. circinatum* sur des insectes de type scolyte par le biais d'un test de détection par PCR (Polymerase Chain Reaction) en temps-réel qui cible des régions spécifiques du génome de cette espèce.

Ces méthodes sont qualitatives, elles permettent de détecter *F. circinatum* 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 *F. circinatum* ou contaminés à un niveau trop faible pour être mis en évidence par la technique utilisée.

La méthode utilisée permet de traiter simultanément des échantillons constitués de 1 à 10 scolytes.

De nombreuses espèces de *Fusarium* phylogénétiquement proches (y compris non formellement décrites) de *F. circinatum* peuvent être présentes dans les mêmes matrices. Afin de sécuriser la spécificité de détection de *F. circinatum*, le séquençage du produit positif de PCR par le LNR peut permettre de confirmer avec certitude l'identité de ce dernier.

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

Objets susceptibles d'être soumis à analyse : Cette méthode concerne uniquement les insectes de type scolyte (Sous-famille des *Scolitinae*).

Limitations relatives aux objets susceptibles d'être soumis à analyse : Cette méthode a été mise au point et validée sur des *Ips sexdentatus*. Les critères de performance de la méthode pour la détection de *F. circinatum* sur d'autres espèces et genres d'insectes de la sous-famille des *Scolitinae* sont inconnus et tout résultat d'analyse sur d'autres insectes devra faire l'objet d'un avertissement.

Grandeur de l'objet soumis à analyse : L'objet soumis à analyse peut être un insecte seul ou un groupe comportant jusqu'à 10 insectes. En cas de nombre supérieur d'insectes reçu dans un même échantillon pour analyse, il conviendra de les grouper par séries de maximum 10 et d'analyser chaque série individuellement.

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



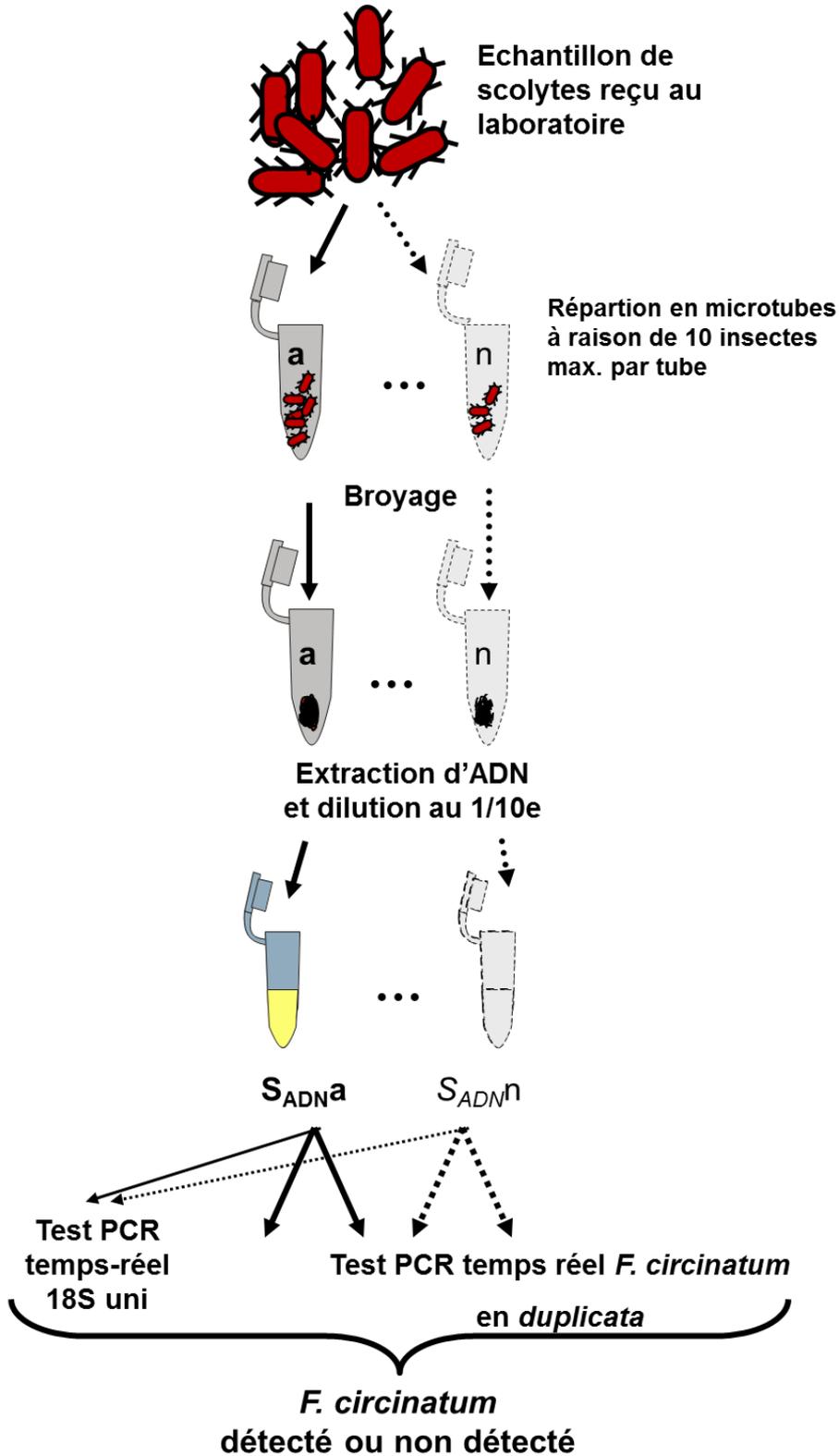
3. Termes, sigles et définitions

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





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 Eau

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

5.2 Kits d'extraction d'ADN de plante

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 utilisé lors de la caractérisation et validé pour cette méthode est le DNeasy Plant Mini kit (Qiagen) (Fourrier et al., 2014, dossier LNR de validation de la méthode MIAM 002).

5.3 Oligonucléotides

6. Cible	Amorce sonde	ou Sequence (5'-3')
<i>F. circinatum</i>	FCIR-F ^a	TCGATGTGTCGTCTCTGGAC
	FCIR-R ^a	CGATCCTCAAATCGACCAAGA
	FCIR-P ^a	[FAM]-CGAGTCTGGCGGGACTTTGTGC-[BHQ1]
Plante/insecte	18S uni-F ^a	GCAAGGCTGAAACTTAAAGGAA
	18S uni-R ^a	CCACCACCCATAGAATCAAGA
	18S uni-P ^a	[JOE]-ACGGAAGGGCACCACCAGGAGT-[BHQ1]

^a (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 utilisé lors de la caractérisation et validé pour cette méthode est le qPCR core kit no ROX (Eurogentec) (Fourrier et al., 2014, dossier LNR de validation de la méthode MIAM 002).



5.5 Autres consommables à usage unique

- Microtubes de lysing matrix A (MP BioMedicals)
- 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 à l'aide de 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 d'insecte ou de champignon est présent dans un extrait, sans effet inhibiteur suffisant (loos *et al.*, 2009). Toutefois, les prises d'essai qui sont positives pour le test *F. circinatum* ne nécessiteront pas systématiquement de contrôle de la qualité d'ADN. Ce test sera réalisé dans une réaction distincte du test de détection de *F. circinatum*. 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) moyen généré est dans une gamme de Ct acceptable, préalablement déterminée expérimentalement par le laboratoire, sur ce type de matrice (*Ips sexdentatus*) et 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 18.8 (Fourrier et al. (2014), Dossier LNR de validation de la méthode MIAM002).*
- Un témoin négatif d'extraction ($T_{-extr.}$) Un témoin négatif d'extraction ($T_{-extr.}$) sera préparé pour toute série d'extractions. Une prise d'échantillon "vide", 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). Le T_{-extr} sera lui aussi traité comme un échantillon pour analyse, c'est à dire broyé, suite à quoi une unique prise d'essai d'environ 500 µl sera réalisée pour extraction d'ADN.

- Un témoin positif (T_{+18S Ips}) 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 Ips} 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 d'*Ips*, ou d'une solution d'ADN d'*Ips* à une concentration similaire à ce qui est obtenu en moyenne à partir d'échantillons 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 FCIR-F/-R/-P. 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 *F. circinatum* puisse avoir été détectée dans un échantillon par ce protocole. Ce T_{+LOD} est constitué d'une solution calibrée d'ADN génomique d'une souche référencée de *F. circinatum* ou d'une solution calibrée de plasmides bactériens dans lesquels est clonée la cible du test PCR FCIR-F/-R/-P. 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.
Dans les conditions de développement et de validation de ce test, la limite de détection du test a été déterminée à 20 copies plasmidiques de cible par tube de PCR (Fourrier et al. (2014), Dossier LNR de validation de la méthode MIAM002).
- 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 FCIR-F/-R/-P. 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 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.

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 = $\pm 10\%$
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.
- Système de broyage – homogénéisation de type Fast Prep (MP Biomedicals) ou équivalent.
- Poste de sécurité microbiologique pour la préparation des prises d'essai.
- Hotte à flux laminaire ou poste de sécurité microbiologique pour préparation du mélange réactionnel et chargement des échantillons dans les tubes de PCR (si possible deux hottes ou postes séparés).

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 d'insectes de type scolyte. 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 $\pm 5^{\circ}\text{C}$. 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 d'insectes reçu au laboratoire, les insectes sont répartis en n groupes de maximum 10 individus de façon aléatoire à l'aide d'une pince préalablement désinfectée (par exemple si 32 individus reçus, 3 groupes de 10 et un groupe de 2, ou 4 groupes de 8 seront préparés). Chacun des n groupes contenant de 1 à 10 individus sera transféré dans un microtube de lysing matrix A et constituera une prise d'essai (numérotées de 1 à n).



8.2 Broyage des prises d'essai et extraction d'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. Ajouter le volume de tampon de lyse préconisé par le fabricant de kit d'extraction d'ADN dans chaque tube de prise d'essai i (1 à n). 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).
3. Placer le microtube sur le portoir du broyeur et broyer environ 1 minute, à 6 unités du Fast Prep.
4. Centrifuger le microtube quelques secondes après le broyage pour faire descendre l'échantillon au fond du tube et réduire la mousse.
5. Incuber chaque tube environ 20 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 précipiter.
6. A la fin de l'incubation centrifuger les tubes environ 2 min à environ 11 000 g. Prélever le surnageant pour poursuivre l'extraction.
7. 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.
8. A la fin du mode opératoire prescrit par le fabricant, l'ADN total extrait est élué dans le volume final recommandé par le fournisseur de kit d'extraction. Cette solution d'ADN total sera ensuite diluée au 1/10^e dans le tampon d'élution fourni avec le kit d'extraction d'ADN utilisé et cette dilution constituera la solution (extrait) d'ADN directement analysée par PCR en temps réel ($S_{ADN\ 1}$ à $S_{ADN\ n}$).

8.3 Test de détection par PCR en temps réel

Préparation et distribution du mélange réactionnel de détection FCIR-F/-R/-P

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

Composé	Concentration finale
Eau Ultra Pure	qsp 18 μ l
qPCR Core Kit No ROX (Eurogentec)	
Reaction Buffer	1 X
Chlorure de Magnésium	5 mM
dNTPs mix	4 x 200 μ M
DNA Polymerase	0.025 U/ μ l
Amorce sens FCIR-F	0.3 μ M
Amorce antisens FCIR-R	0.3 μ M
Sonde FCIR-P	0.1 μ M



1. Le mélange réactionnel se prépare dans un microtube stérile de 1.5 ou 2 ml.
2. Les différents composants, excepté la polymérase à ADN, 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 mélange réactionnel complet doit être passé au vortex pendant au moins 5 secondes avant sa distribution.
5. Le mélange réactionnel 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 correspondant aux différentes prises d'essai (S_{ADN_i} avec i allant de 1 à n) 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 testés 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 FCIR-F/-R/-P

Les différents paramètres de la PCR en temps réel pour la détection de *F. circinatum* sont les suivants (Ioos *et al.*, 2009) :

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	15 sec	40
3	Hybridation - polymérisation	70°C	55 sec puis mesure de la fluorescence FAM	

* 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.



Paramètres de l'amplification par PCR en temps réel 18S uni-F/-R/-P

Ce test sera réalisé en parallèle du test de détection de *F. circinatum*. La composition du mélange réactionnel est identique à celui indiqué pour la recherche de *F. circinatum*, en substituant simplement les amorces et la sonde FCIR-F/-R/-P par les amorces et la sonde 18S uni -F/-R/-P. Les conditions d'amplification sont identiques à celles employées pour la recherche de *F. circinatum*, mis à part la température d'hybridation/synthèse qui est fixée à 65°C, le nombre de cycles nécessaire qui est fixé à 30 et la lecture de fluorescence qui correspond au fluorophore JOE. Les extraits d'ADN sont testés en *duplicata*.

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 *F. circinatum*.

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 n prises d'essai sont analysés individuellement suivant les règles de décision présentées en annexe 2 (tables décisionnelles). Sur la base de ces résultats le statut de l'échantillon est déterminé comme suit :

- Pour qu'un échantillon soit déclaré positif, il suffit qu'au moins une des n prises d'essai soit positive. Le résultat sera exprimé par une phrase du type « *F. circinatum* détecté dans l'échantillon analysé »
- Pour qu'un échantillon soit déclaré négatif, il faut que les n prises d'essai soient négatives. Le résultat sera alors exprimé par une phrase du type « *F. circinatum* non détecté dans l'échantillon analysé ».
- Un échantillon sera déclaré de statut indéterminé si au moins une des n prises d'essai est de statut indéterminé et les autres non positives. Le résultat sera alors exprimé par « résultat indéterminé pour l'échantillon analysé », et il conviendra de mentionner dans les commentaires la cause de l'indétermination (présence de composés inhibiteurs ou quantité d'ADN extrait insuffisante), ainsi qu'une phrase pondérant le niveau d'indétermination. Par exemple : « L'échantillon pour analyse comprenait x insectes, qui ont été répartis en n prises d'essais. *F. circinatum* n'a pas été détecté dans y prises d'essai et le résultat est indéterminé pour $n-y$ prises d'essai ».

10 Caractéristiques de performance de la méthode

Critère de performance	Résultats obtenus
Caractéristiques de la réaction de PCR en temps réel	<ul style="list-style-type: none">• L'efficacité de la réaction monoplex sur une gamme d'extraits d'ADN génomique cible préparée dans de l'eau ultra-pure a été évaluée à 1,01 avec le Core kit No ROX (Eurogentec).• Le R^2 calculé pour la gamme est de 0,99.
Sensibilité analytique	La sensibilité analytique a été estimée à 474 copies plasmidiques (cp) d'ADN cible par tube de PCR (soit 23,7 cp/ μ L) pour une réaction monoplex avec dilution dans de l'eau ultra-pure en utilisant le Core kit No ROX (Eurogentec).
Spécificité analytique	La spécificité analytique a été évaluée sur 9 isolats de <i>F. circinatum</i> , 58 isolats de champignons génétiquement proches de <i>F. circinatum</i> ou qui partagent les mêmes hôtes et sur 17 extraits d'ADN provenant de différents organes de végétaux sains, en utilisant le Core kit No ROX (Eurogentec). Lors de cette caractérisation le test a été 100% spécifique.
Inclusivité	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 d'isolats de <i>F. circinatum</i> (9 isolats) de différentes provenances géographiques, en utilisant le Core kit No ROX (Eurogentec). Lors de cette caractérisation le test a été 100% inclusif.



<p>Répétabilité et reproductibilité</p>	<p>La répétabilité et la reproductibilité ont été évaluées sur 10 réplicats d'une solution plasmidique calibrée dosée à 3 concentrations dont une proche de la limite de détection et sur 10 réplicats d'ADN extrait d'un échantillon de semences de pin naturellement contaminé, en utilisant le Core kit No ROX (Eurogentec).</p> <p>Les résultats sont présentés dans le tableau ci-dessous :</p>					
	Cible	concentration (en copies plasmidiques)	CV (%)		résultat qualitatif	
			répétabilité	reproductibilité	répétabilité	reproductibilité
	Solution plasmidique	47400	0.61	5.38	+	+
		4740	0.90	5.06	+	+
474 (LOD)		2.37	5.10	+	+	
Echantillon	nd	0.51	5.79	+	+	
<p>Les résultats qualitatifs sont 100% positifs. Les coefficients de variations sont tous inférieurs à 10%.</p> <p>Le test est donc répétable et reproductible.</p>						



Annexe 1 Tables décisionnelles

Table A			
Test FCIR sur S_{ADNi}			
Type résultat	Prise d'essai S _{ADNi}	Action	Interprétation / démarche à suivre
1	+/+	FIN	F. circinatum détecté dans la prise d'essai i.
2	+/-	Refaire test F CIR sur S _{ADNi}	Suite au nouveau test FCIR : <ul style="list-style-type: none">• Si résultat type 1 obtenu : F. circinatum détecté dans la prise d'essai i.• Si résultat type 2 ou 3 obtenu, procéder à l'interprétation des résultats du test 18S uni sur S_{ADNi} (Table B).
3	-/-	procéder à l'interprétation des résultats du test 18S uni sur S _{ADNi}	Cf Table B.

Table B			
Test 18S uni sur S_{ADNi}			
Type résultat	Prise d'essai S _{ADNi}	Action	Interprétation / démarche à suivre
1	+/+	FIN	F. circinatum non détecté dans la prise d'essai i.
2	+/-	Refaire le test 18S uni sur S _{ADNi} diluée au 1/10 ^e dans le tampon d'élution du kit d'extraction d'ADN.	Suite au nouveau test 18S uni : <ul style="list-style-type: none">• Si résultat type 1 obtenu : refaire le test FCIR sur S_{ADNi} diluée et interpréter les résultats dans selon la table C.• Si résultat type 2 ou 3 obtenu, résultat indéterminé dans la prise d'essai i pour cause de présence de composés inhibiteurs de PCR.
3	-/-	Refaire le test 18S uni sur S _{ADNi} diluée au 1/10 ^e dans le tampon d'élution du kit d'extraction d'ADN.	Suite au nouveau test 18S uni : <ul style="list-style-type: none">• Si résultat type 1 obtenu : refaire le test FCIR sur S_{ADNi} diluée au 1/10^e et interpréter les résultats dans selon la table C.• Si résultat type 2 ou 3 obtenu, résultat indéterminé dans la prise d'essai i pour cause de présence de composés inhibiteurs de PCR.



Table C			
Test FCIR sur S _{ADNi} diluée au 1/10 ^e			
Type résultat	Prise d'essai S _{ADNi}	Action	Interprétation / démarche à suivre
1	+/+	FIN	F. circinatum détecté dans l'échantillon pour analyse
2	+/-	Refaire test FCIR sur S _{ADNi} diluée au 1/10 ^e	Suite au nouveau test FCIR : <ul style="list-style-type: none"> • Si résultat type 1 obtenu, F. circinatum détecté dans la prise d'essai i • Si résultat type 2 ou 3 obtenu, F. circinatum non détecté dans la prise d'essai i.
3	-/-	FIN	F. circinatum non détecté dans la prise d'essai i



Bibliographie

Fourrier C, Antoine S, Piou D, loos R, 2014. Rapid detection of *Fusarium circinatum* propagules on trapped pine beetles. *Forest Pathology* in press.

loos 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, 582-90.