

Méthode d'analyse en santé des végétaux

RÉFÉRENCE : ANSES/LSV/MA070- Version 1

Mars 2024

Détection de *Venturia nashicola* par PCR en temps réel



Hideo Ishii, Ministry of Agriculture, Forestry & Fisheries, Bugwood.org

Laboratoire de la santé des végétaux

Laboratoire national de référence " tous champignons sur toutes matrices sauf exceptions mentionnées dans l'arrêté du 30 mars 2023"



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			Version initiale

* La version 1 a fait l'objet d'une consultation du 10/07/2023 au 15/08/2023 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 Mycologie

Laboratoire National de Référence Champignons phytopathogènes sur toute matrice

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

Contact : nancy.lsv@anses.fr

La présente méthode a été mise au point par l'unité de mycologie du Laboratoire de la Santé des Végétaux dans le cadre du projet AAP CASDAR (appel à projets 2017) recherche technologique 1716 CREATIVE.

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

Sommaire

Avant-propos	4
Introduction	7
Avertissements et précautions de sécurité	8
1. Objet et domaine d'application	9
2. Documents de référence	9
3. Termes, sigles et définitions	9
4. Principe de la méthode	10
5. Réactifs	11
5.1 Eau.....	11
5.2 Kits d'extraction d'ADN	11
5.3 Oligonucléotides	11
5.4 Pré-mix de PCR en temps réel	12
5.5 Autres consommables à usage unique	12
5.6 Contrôles et témoins.....	12
6. Appareillage et matériels	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	15
8.1 Préparation des échantillons pour analyse	15
8.2 Broyage des prises d'essai et extraction de l'ADN total	16
8.3 Test de détection par PCR en temps réel	17
9. Résultats	19
9.1 Contrôle de la validité des résultats	19
9.2 Calculs et expression des résultats	19
10. Caractéristiques de performance de la méthode	21
Annexe	26
Bibliographie	27

Table des figures

FIGURE 1 : PRINCIPE DE LA METHODE DE DETECTION DE <i>VENTURIA NASHICOLA</i>	10
FIGURE 2 : DIAGRAMME DECISIONNEL ET FORMULATION DU RESULTAT	26

Table des tableaux

TABLEAU 1 : SEQUENCES DES AMORCES ET SONDAS UTILISEES DANS CETTE METHODE	11
TABLEAU 2 : COMPOSITION DU MELANGE REACTIONNEL VNG8359/VENTSPP	17
TABLEAU 3 : COMPOSITION DU MELANGE REACTIONNEL VNTEF	17
TABLEAU 4 : COMPOSITION DU MELANGE REACTIONNEL 18S UNI	17
TABLEAU 5 : PROGRAMME PCR	18
TABLEAU 6A : PCR DUPLEX VNG8359/VENTSPP REALISEES SUR S_{ADN}	20
TABLEAU 6B : PCR MONOPLEX VNTEF REALISEE SUR S_{ADN}	20
TABLEAU 6C : PCR MONOPLEX 18S UNI REALISEE SUR S_{ADN}	20
TABLEAU 7A : PCR DUPLEX VNG8359/VENTSPP REALISEES SUR S_{ADN} DILUEE 10X	20
TABLEAU 7B : PCR MONOPLEX VNTEF REALISEE SUR S_{ADN} DILUEE 10X	21
TABLEAU 7C : PCR MONOPLEX 18S UNI REALISEE SUR S_{ADN} DILUEE 10X	21
TABLEAU 8 : SYNTHESE DES CARACTERISTIQUES DE PERFORMANCE	21

Introduction

Venturia nashicola est un champignon ascomycète. Il est l'agent principal de tâches nécrotiques sur les fruits et les feuilles. Ce champignon ne s'attaque qu'aux poiriers asiatiques (*Pyrus pyrifolia*, *P. ussuriensis* et *P. bretschneideri*). La maladie due à ce champignon (scab) provoque de nombreux dégâts sur les fruits, avant et après récolte avec notamment des déformations rendant le fruit impropre à la vente. *V. nashicola* est absent de la zone UE, mais la présence de l'hôte dans différents pays de l'Union européenne et les conditions climatiques propices à son développement justifient son statut d'organisme de quarantaine. Son introduction sur le territoire est donc étroitement surveillée. Différents tests de détection étaient disponibles dans la littérature, mais ces derniers ne sont cependant pas suffisamment spécifiques ou sensibles. Le projet CASDAR CREATIVE avait entre autres pour but de développer un test sensible, spécifique et fiable, utilisable en routine dans le cadre de contrôles réglementaires pour la détection de *V. nashicola*. Ce test est couplé à un test de détection genre spécifique (Ventspp) capable de détecter n'importe quelle espèce appartenant au genre *Venturia*. Ce travail de recherche CASDAR a permis la production de cette méthode d'analyse Anses.

Cette méthode qualitative permet de détecter la présence de *Venturia nashicola* dans les fruits et les feuilles par la technique de PCR (Polymerase Chain Reaction) en temps réel.

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 doit être en accord avec la réglementation en vigueur dans la région où se situe le laboratoire d'analyse.

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 peuvent être éliminés sans traitement particulier.

1. Objet et domaine d'application

L'objet de cette méthode est de détecter la présence de *Venturia nashicola* sur fruits et feuilles présentant des symptômes de *Pyrus pyrifolia* et à partir de culture pure. La présence de cette espèce est mise en évidence par un test de détection par PCR (Polymerase Chain Reaction) en temps réel utilisant une combinaison d'amorces et de sondes d'hydrolyse. Cette méthode est qualitative : elle permet de détecter *V. nashicola* dans la limite du seuil de détection des techniques employées sans objectif de quantification.

Les échantillons pour lesquels une réponse négative est obtenue sont considérés comme indemnes de cette espèce ou contaminés à un niveau trop faible pour être mis en évidence par les techniques utilisées.

Cette méthode a été initialement mise au point et validée sur des cultures pures de *Venturia nashicola* ainsi que sur des fruits de nashi. Cependant, cette méthode peut s'appliquer également sur des feuilles de *Pyrus pyrifolia* présentant des lésions nécrotiques par analogie aux résultats de validation obtenus avec l'orthologue du marqueur VnG8359 sur des feuilles de *Pyrus communis* (détection de *Venturia pirina*, voir dossier **MIAM010**).

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 général et technique en vigueur au LNPV.

3. Termes, sigles et définitions

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

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

4. Principe de la méthode

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

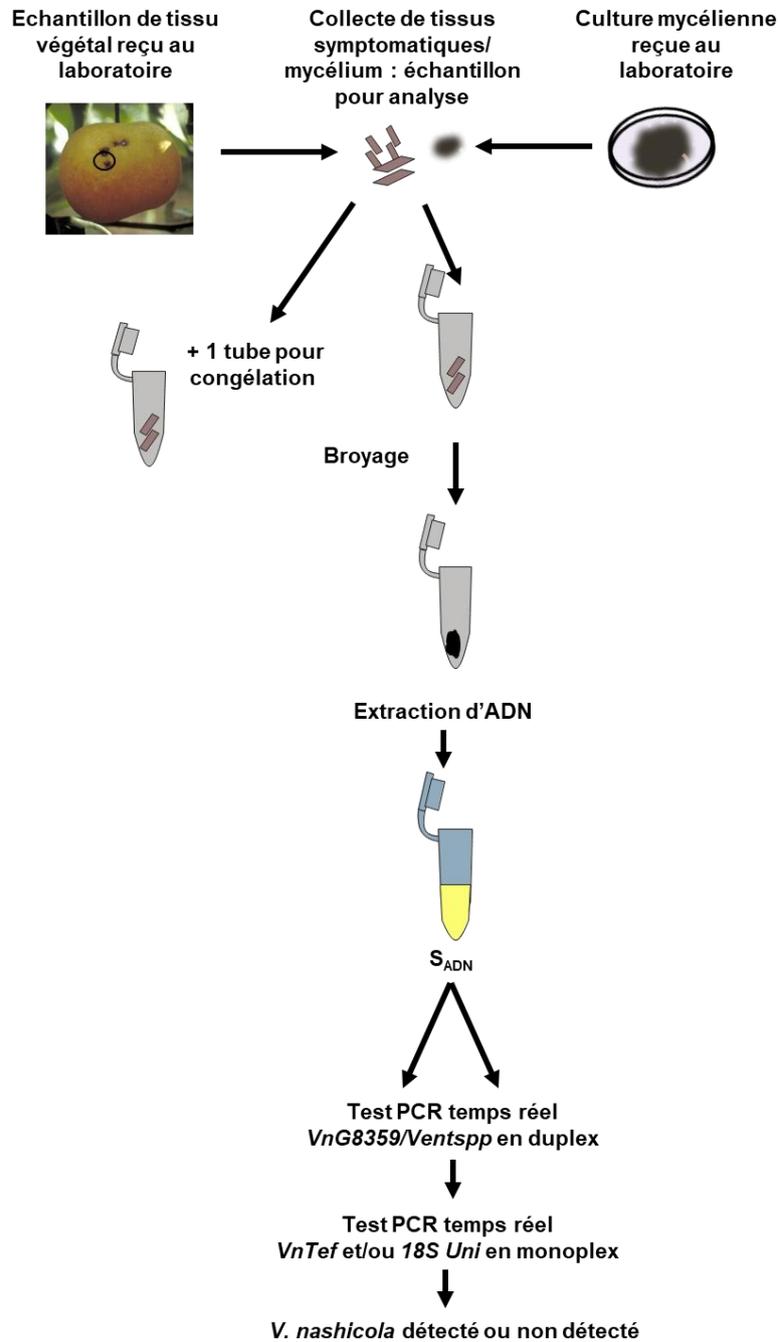


Figure 1 : Principe de la méthode de détection de *Venturia nashicola*

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

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

5.1 Eau

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

5.2 Kits d'extraction d'ADN

L'ADN total des échantillons analysés (à la fois ADN végétal et ADN de microorganismes présent sur le prélèvement) est extrait et purifié à l'aide d'un mini kit d'extraction d'ADN de plante disponible dans le commerce. Le kit d'extraction initialement validé pour cette méthode est le Nucleospin® Plant II (Macherey Nagel), en utilisant le tampon de lyse PE fourni par le fabricant et du PVPP (cf **Dossier LNR de validation de la méthode MIAM 010**).

5.3 Oligonucléotides

Tableau 1 : séquences des amorces et sondes utilisées dans cette méthode

Cible	Nom	Séquence amorces/sonde	Taille (pb)
<i>V. nashicola</i>	VnTef-F	AGGTAAGGCATCTGTTATTATG	168
	VnTef-R	ATCGGAAAAAGTTGGGAGTA	
	VnTef-P	FAM-ACCTTTCGGACACGGCAAAT-BHQ®1	
<i>Venturia spp</i>	Ventspp-F	ACAACGGATCTCTTGGTTCTG	253
	Ventspp-R	GCGAGGGATTCTCTTGCTAC	
	Ventspp-P	Cy5-CCTGTTTCGAGCGCCATTCTAC-BHQ®2	
<i>V. nashicola</i>	VnG8359-F	GTATGAATGCTTGCCGACTATT	180
	VnG8359-R	TCCCTCCTCAATATCAACCAT	
	VnG8359-P	FAM-ATGGGGTGTCCATCTCTATA*GCTAAGA	

¹ Le quencher BHQ®1 est intercalé, et non en 3' dû à la longueur de la sonde

D'autres fluorophores rapporteurs peuvent être utilisés pour chaque sonde, sous réserve que le fluorophore extincteur associé soit adapté.

5.4 Pré-mix de PCR en temps réel

Plusieurs kits d'amplification ont été validés pour cette méthode, notamment le Takyon No Rox Probe MasterMix blue dTTP (Eurogentec) (cf **Dossier LNR de validation de la méthode MIAM 010**, Muller et al. (2024)).

5.5 Autres consommables à usage unique

- Microcônes stériles à filtre de volume adapté
- 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.
- Microtubes de lysing matrix A (MP Biomedicals) ou tout autre consommable permettant d'obtenir une qualité de broyage équivalente pour le broyage des tissus lignifiés et des fruits (cf **Dossier LNR de validation de la méthode MIAM 0010**).
- Microtubes de lysing matrix C (MP Biomedicals) ou microtubes stériles de 2 mL à vis contenant environ 8 mg de billes de verre stérilisées de diamètre de 0.75 à 1 mm (VWR, réf 4122917) ou tout autre consommable permettant d'obtenir une qualité de broyage équivalente pour le broyage des cultures pures (cf **Dossier LNR de validation de la méthode MIAM 010**).

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 :

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

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

- **Un contrôle de la qualité de l'extraction d'ADN et de la présence d'inhibiteurs pourra être 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 (Ioos et al. 2009). Toutefois, les prises d'essai qui sont positives pour le test ciblant *V. nashicola* ne nécessiteront pas systématiquement de contrôle de la qualité d'ADN. Ce test permet de générer un signal de fluorescence de nature exponentielle significativement supérieur au bruit de fond si de l'ADN de plante est présent dans un extrait, sans effet inhibiteur suffisant. Ce test sera réalisé en monoplex et pourra être réalisé dans le même run que le test VnG8359. 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 solution d'ADN (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 dans ses propres conditions.

Dans les conditions de validation de ce test et pour des échantillons de fruits de *Pyrus pyrifolia*, la valeur maximale acceptable de Ct pour le test 18S Uni a été déterminée à 17,10.

- **Un témoin négatif d'extraction ($T_{-extr.}$)** sera préparé pour toute série d'extractions. Une prise d'échantillon "vide" ($=T_{-extr.}$), c'est-à-dire un microtube vide de lysing matrix A ou C de 2 mL stérile, subira donc toutes les phases de l'analyse (prise d'essai-broyage-extraction-PCR) pour vérifier l'absence de contamination lors de la prise d'essai et de la phase d'extraction d'ADN (1er type de faux positif) et sera testé en duplicata lors de chaque réaction de PCR en temps réel pour vérifier l'absence de contamination croisée entre échantillons ou de contamination externe lors de la phase d'extraction d'ADN. Le tube faisant fonction de $T_{-extr.}$ doit impérativement être ouvert avant toute manipulation d'échantillons, rester ouvert pendant toute la phase de manipulation des échantillons, et être refermé à la fin de la manipulation des échantillons, et ce, à chaque étape pendant laquelle les tubes d'échantillons doivent être ouverts.
- **Un témoin positif T_+** sera systématiquement testé en duplicata lors de chaque réaction de PCR en temps réel Ventspp et/ou 18S Uni. Il permet de vérifier que la réaction PCR Ventspp et/ou 18S Uni s'est effectuée de façon correcte. Ce T_+ est constitué d'une solution calibrée d'ADN génomique dosée à 1 ng/ μ L obtenue à partir d'un échantillon contaminé par *V. nashicola*, *V. pirina*, *V. inaequalis* ou toute autre espèce de *Venturia*.
- **Un témoin positif en limite pratique de détection (T_{+LOD})** sera systématiquement testé en duplicata lors de chaque réaction de PCR en temps réel. 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 *V. nashicola* puisse avoir été détectée dans un échantillon par ce protocole. Ce T_{+LOD} est constitué d'une solution calibrée de plasmides bactériens dans lesquels sont insérées la cible des tests PCR VnG8359-F/-R/-P ou VnTef-F/-R/-P. Ce T_{+LOD} doit être caractérisé par le laboratoire dans ses propres conditions. En pratique, le T_{+LOD} a été ici défini comme la plus petite quantité de cible produisant un résultat positif dans 100 % des cas.

Dans les conditions de validation du LNR, la limite de détection du test a été estimée à 454 et 48 copies plasmidiques de cible respectivement pour les tests VnG8359 et VnTef par tube de PCR (cf Dossier LNR de validation de la méthode MIAM 010).

- **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. 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.

Les considérations d'ordre métrologique à appliquer sont celles de la MOA 022 ou de la norme ISO 8655 (versions en vigueur).

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 fluorophores de type « FAM », « Cy5 » et « JOE » ou des fluorophores de spectres équivalents. Cette méthode a été validée sur un appareil Rotorgene 6500, Corbett Research/Qiagen (cf **Dossier LNR de validation de la méthode MIAM 010**).
- Poste de sécurité microbiologique pour la préparation des prises d'essai.
- Cette méthode a été validée en utilisant un broyeur de tissu orbital oscillant (de type Fast Prep, MP Biomedicals) avec adaptateur et portoirs pour tubes de 2 mL. Tout autre système de broyage peut être utilisé, pourvu qu'il permette d'obtenir une qualité de broyage équivalente.
- 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'au moins un fruit ou une feuille présentant des symptômes, ou d'une culture fongique (cf. Annexe 1). 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 phytosanitaire » doit figurer à l'extérieur du colis.

Fiche de demande d'analyse :

Formulation claire de la demande, 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 15 jours. L'échantillon devra pendant ce temps être conservé à $5^{\circ}\text{C}\pm 3^{\circ}\text{C}$. Les prises d'essai en microtubes peuvent être conservées congelées jusqu'à 6 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. 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, dans le cadre des missions qui lui sont confiées.

8. Mode opératoire**8.1 Préparation des échantillons pour analyse**

La prise d'essai se réalise de préférence sous hotte permettant la réalisation des manipulations en conditions stériles. Chaque échantillon est traité individuellement.

Le tube faisant office de témoin négatif d'extraction est placé ouvert sur le poste de travail avant la manipulation des échantillons pour prise d'essai et refermé en fin de prélèvement.

La prise d'essai s'effectue sur des fruits présentant des symptômes typiques d'une infection par *Venturia* (cf. annexe 1) ou à partir d'une culture fongique.

- A partir de fruits, de fines lamelles de la surface du fruit (maximum de 2 mm d'épaisseur) sont prélevées à l'aide d'une lame de scalpel stérile et placées dans un microtube de lysing matrix A, en veillant à ne pas dépasser un volume représentant environ $\frac{1}{4}$ du tube. Prélever uniquement dans les zones nécrosées et préférentiellement dans celles présentant des coussinets sporifères (biomasse de *Venturia* plus importante à ces endroits).
- A partir d'une culture pure, le prélèvement doit s'effectuer sur une culture de moins de 2 mois. Le mycélium sera prélevé en raclant la surface de la culture à l'aide d'une lame de scalpel stérile et placé dans un tube de Lysing matrix C ou équivalent. La quantité à prélever doit correspondre au volume d'une bille d'environ 3-4 mm de diamètre.

A cette étape, il est recommandé de préparer, si possible, un tube supplémentaire contenant le reliquat de fragments, de l'identifier et de le conserver congelé en cas de nécessité de confirmation des cas positifs par un laboratoire de référence.

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

1. Déposer et ouvrir le tube faisant office de témoin négatif d'extraction sur le plan de travail pendant toute la durée de la manipulation des échantillons.
2. **Avant ouverture du microtube contenant la prise d'essai**, centrifuger brièvement le microtube afin de recueillir toutes les particules constituant l'échantillon au fond du microtube et débarrasser le capuchon de tout reliquat d'échantillon.
3. Ajouter le volume de tampon de lyse préconisé par le fabricant de kit d'extraction d'ADN dans chaque tube de prise d'essai et environ 15 mg de PVPP. 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, fournie avec le kit d'extraction. Le volume à ajouter est celui préconisé par le fabricant.
4. Placer le microtube sur le portoir du broyeur FastPrep et broyer environ 1 minute à 6,5 unités. Recommencer cette étape une deuxième fois.
5. Centrifuger le microtube quelques secondes après le broyage pour recueillir l'échantillon au fond du tube et réduire la mousse.
6. Incuber chaque tube entre 15 et 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 réhomogénéiser leur contenu qui aura tendance à sédimenter.
7. A la fin de l'incubation centrifuger les tubes environ 5 min à vitesse maximale. Prélever le surnageant pour poursuivre l'extraction.
8. Le surnageant prélevé est transféré dans un nouveau microtube stérile ou dans la première colonne de filtration du kit d'extraction d'ADN. Le microtube contenant le culot cellulaire est détruit. L'extraction d'ADN se poursuit ensuite en suivant les recommandations du fournisseur du kit d'extraction d'ADN.

9. A la fin du mode opératoire prescrit par le fabricant, l'ADN total issu de fruits ou de culture pure est élué dans un volume final de 100 μL de tampon d'élué. La solution d'ADN total issu de fruits ou de culture pure devra être diluée 10 fois. Ces solutions constitueront la solution (extrait) d'ADN directement analysée par PCR en temps réel (S_{ADN}).

8.3 Test de détection par PCR en temps réel

Préparation et distribution du mélange réactionnel de détection

La composition des mélanges réactionnels (volume réactionnel de 20 μL) est la suivante :

PCR temps réel duplex VnG8359/Ventspp :

Tableau 2 : composition du mélange réactionnel VnG8359/Ventspp

Composé	Concentration finale
Eau Ultra Pure	qsp 18 μL
Takyon No Rox Probe MasterMix blue dTTP	1x
Amorce sens Ventspp-F	0.3 μM
Amorce antisens Ventspp-R	0.3 μM
Sonde Ventspp-P	0.1 μM
Amorce sens VnG8359-F	0.3 μM
Amorce antisens VnG8359-R	0.3 μM
Sonde VnG8359-P	0.1 μM

PCR temps réel monoplex de confirmation VnTef :

Tableau 3 : composition du mélange réactionnel VnTef

Composé	Concentration finale
Eau Ultra Pure	qsp 18 μL
Takyon No Rox Probe MasterMix blue dTTP	1x
Amorce sens VnTef-F	0.3 μM
Amorce antisens VnTef-R	0.3 μM
Sonde VnTef-P	0.1 μM

PCR temps réel monoplex 18S Uni :

Tableau 4 : composition du mélange réactionnel 18S Uni

Composé	Concentration finale
Eau Ultra Pure	qsp 18 μL
Takyon No Rox Probe MasterMix blue dTTP	1x
Amorce sens 18S Uni-F	0.3 μM
Amorce antisens 18S Uni-R	0.3 μM
Sonde 18S Uni-P	0.1 μM

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

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

1. Les différentes solutions S_{ADN} correspondant aux différentes prises d'essai sont testées en duplicata (2 tubes ou capillaires PCR individuels) à raison de 2 µL par microtube de PCR à l'aide d'une micropipette munie d'un microcône stérile à embout filtre.
2. Les S_{ADN} des différents contrôles sont ajoutées et testées en duplicata : T_{-extr} , T_{+LOD} , etc. Pour le T- (NTC), 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

Les différents paramètres de la PCR en temps réel pour la détection de *V. nashicola* sont les suivants :

Tableau 5 : programme PCR

Etape		Température de consigne	Durée programmée	Nombre de cycles
1	Dénaturation initiale et activation de la polymérase à ADN*	95 °C	3 min	1
2	Dénaturation	95°C	15 sec	40
3	Hybridation - polymérisation	61°C	60 sec puis mesure de la fluorescence	

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

9. Résultats

9.1 Contrôle de la validité des résultats

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

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

- a) Aucun des réplicats de T_{-extr} n'a généré de fluorescence « FAM » ou « Cy5 » 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}.
- b) Aucun des réplicats de T- (NTC) n'a généré de fluorescence « FAM » ou « Cy5 » 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}.
- c) 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 *V. nashicola*.

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 moyen du contrôle T_{+LOD} (=Ct_{LOD}) : les extraits d'ADN testés lors de la réaction validée dont le Ct moyen est inférieur ou égal à Ct_{LOD} seront considérés comme positifs.

Les règles décisionnelles sont résumées dans les tableaux ci-dessous :

Tableau 6A : PCR duplex VnG8359/Ventspp réalisées sur S_{ADN}

Test VnG8359		Test Ventspp		Décision et résultat si opportun
Puits 1	Puits 2	Puits 1	Puits 2	
+	+			confirmer la détection de <i>V. nashicola</i> avec le test VnTef, cf tableau 6B
-	-	+	+	suspicion de présence, faire des analyses complémentaires ¹
-	-	-	-	vérifier la qualité de l'ADN avec le test 18S Uni, cf tableau 6C
+	-	+	-	Refaire, si de nouveau un seul puits sur les deux génère une valeur positive, faire des analyses complémentaires ¹

Tableau 6B : PCR monoplex VnTef réalisée sur S_{ADN}

Test VnTef		Décision et résultat si opportun
Puits 1	Puits 2	
+	+	Arrêt de l'analyse : <i>V.nashicola</i> détecté
-	-	suspicion de présence, faire des analyses complémentaires ¹
+	-	Refaire, si de nouveau un seul puits sur les deux génère une valeur positive, faire des analyses complémentaires ¹

Tableau 6C : PCR monoplex 18S Uni réalisée sur S_{ADN}

Test 18S Uni		Décision et résultat si opportun
Puits 1	Puits 2	
+ ²	+ ²	Arrêt de l'analyse : <i>V.nashicola</i> non détecté
_ ³	_ ³	Refaire le duplex VnG8359/Ventspp sur S _{ADN} dilué 10 fois et suivre les tableaux 7A,B et C pour les règles décisionnelles
+ ²	_ ³	Refaire, si de nouveau un seul puits sur les deux génère une valeur positive, faire des analyses complémentaires ¹

Tableau 7A : PCR duplex VnG8359/Ventspp réalisées sur S_{ADN} diluée 10X

Test VnG8359		Test Ventspp		Décision et résultat si opportun
Puits 1	Puits 2	Puits 1	Puits 2	
+	+			confirmer la détection de <i>V. nashicola</i> avec le test VnTef
-	-	+	+	suspicion de présence, faire des analyses complémentaires ⁴
-	-	-	-	vérifier la qualité de l'ADN avec le test 18S Uni
+	-	+	-	Refaire, si de nouveau un seul puits sur les deux génère une valeur positive, faire des analyses complémentaires ¹

¹ Les analyses complémentaires peuvent consister en une analyse par PCR temps réel ou conventionnelle basées sur des marqueurs différents, par une analyse par barcoding des amplicons obtenus ou par identification morphologique.

² Valeur de Ct 18S Uni échantillon inférieure au Ct_{seuil} 18S Uni déterminée au laboratoire

³ Valeur de Ct 18S Uni échantillon supérieure au Ct_{seuil} 18S Uni déterminée au laboratoire

⁴ Les analyses complémentaires peuvent consister en une analyse par PCR temps réel ou conventionnelle basées sur des marqueurs différents, par une analyse par barcoding des amplicons obtenus ou par identification morphologique.

Tableau 7B : PCR monoplex VnTef réalisée sur S_{ADN} diluée 10X

Test VnTef		Décision et résultat si opportun
Puits 1	Puits 2	
+	+	Arrêt de l'analyse : <i>V.nashicola</i> détecté
-	-	suspicion de présence, faire des analyses complémentaires¹
+	-	Refaire, si de nouveau un seul puit sur les deux génère une valeur positive, faire des analyses complémentaires ¹

Tableau 7C : PCR monoplex 18S Uni réalisée sur S_{ADN} diluée 10X

Test 18S Uni		Décision et résultat si opportun
Puits 1	Puits 2	
+ ¹	+ ²	Arrêt de l'analyse : <i>V.nashicola</i> non détecté
_2	_3	Arrêt de l'analyse : résultat indéterminé
+ ²	_3	Refaire, si de nouveau un seul puit sur les deux génère une valeur positive, faire des analyses complémentaires ¹

Le diagramme décisionnel simplifié (ne prenant pas en compte les règles à suivre en cas d'amplification pour un seul puits du réplicat) et résumant ces conditions est présenté en annexe.

10. Caractéristiques de performance de la méthode

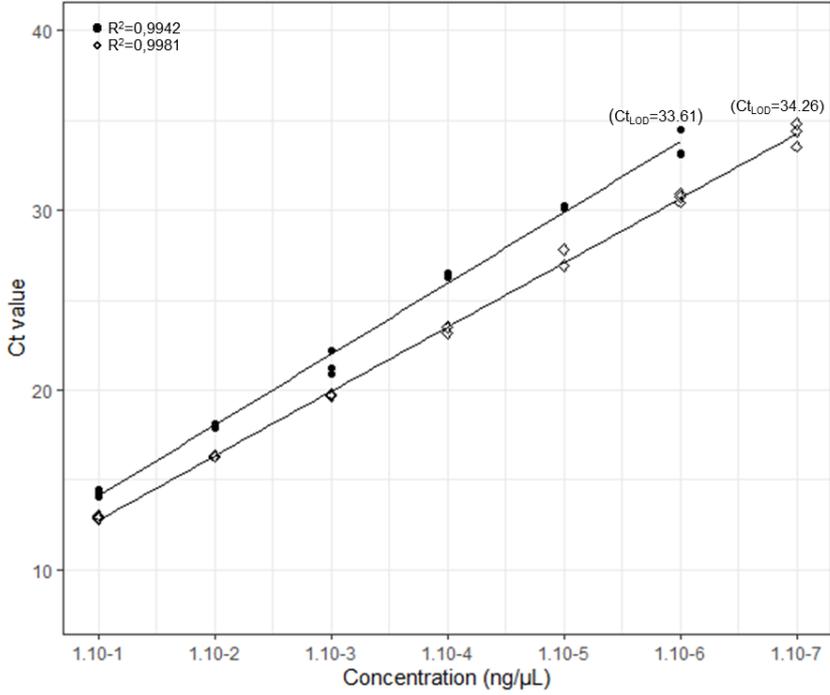
Synthèse des caractéristiques de performance extraite du dossier de validation établi par le LNR « Autres champignons sur toutes matrices » sous la référence MIAM 010.

Tableau 8 : synthèse des caractéristiques de performance

Critère de performance	Résultats obtenus
Caractéristiques de la réaction de PCR temps réel	L'efficacité de la réaction monoplex sur une gamme de solutions plasmidiques calibrées diluées dans du TE (1X), a été évaluée à -VnG8359 : 83,7% (R ² =0.9999) -VnTef : 89,2% (R ² =0.9993)

¹ Valeur de Ct 18S Uni échantillon inférieure au Ct_{seuil} 18S Uni déterminée au laboratoire

² Valeur de Ct 18S Uni échantillon supérieure au Ct_{seuil} 18S Uni déterminée au laboratoire

<p>Sensibilité analytique</p>	<p>La sensibilité analytique a été évaluée à partir d'une gamme de solution d'ADN plasmidique diluée dans du TE 1X. Pour le test VnG8359, la sensibilité a été estimée à 454 copies plasmidiques (cp) par tube de PCR Pour le test Vntef, la sensibilité a été estimée à 48 cp par tube de PCR.</p>  <table border="1" data-bbox="395 577 1225 1272"> <caption>Approximate data points from the Ct value vs Concentration plot</caption> <thead> <tr> <th>Concentration (ng/µL)</th> <th>Ct value (VnG8359)</th> <th>Ct value (Vntef)</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>1.10⁻¹</td> <td>~14</td> <td>~13</td> </tr> <tr> <td>1.10⁻²</td> <td>~18</td> <td>~16</td> </tr> <tr> <td>1.10⁻³</td> <td>~22</td> <td>~19</td> </tr> <tr> <td>1.10⁻⁴</td> <td>~26</td> <td>~23</td> </tr> <tr> <td>1.10⁻⁵</td> <td>~30</td> <td>~27</td> </tr> <tr> <td>1.10⁻⁶</td> <td>~34</td> <td>~31</td> </tr> <tr> <td>1.10⁻⁷</td> <td>~38</td> <td>~35</td> </tr> </tbody> </table>	Concentration (ng/µL)	Ct value (VnG8359)	Ct value (Vntef)	1.10 ⁻¹	~14	~13	1.10 ⁻²	~18	~16	1.10 ⁻³	~22	~19	1.10 ⁻⁴	~26	~23	1.10 ⁻⁵	~30	~27	1.10 ⁻⁶	~34	~31	1.10 ⁻⁷	~38	~35
Concentration (ng/µL)	Ct value (VnG8359)	Ct value (Vntef)																							
1.10 ⁻¹	~14	~13																							
1.10 ⁻²	~18	~16																							
1.10 ⁻³	~22	~19																							
1.10 ⁻⁴	~26	~23																							
1.10 ⁻⁵	~30	~27																							
1.10 ⁻⁶	~34	~31																							
1.10 ⁻⁷	~38	~35																							
<p>Spécificité analytique</p>	<p>La spécificité analytique du test a été évaluée <i>in vitro</i> sur 46 isolats de <i>Venturia</i> spp., dont 20 isolats de <i>V. nashicola</i>, et sur 11 isolats de champignons proches de <i>Venturia</i> ou retrouvés fréquemment sur les fruitiers.</p> <p>Le test est 100% spécifique.</p>																								
<p>Inclusivité</p>	<p>L'inclusivité du test PCR en temps réel a été démontré <i>in vitro</i> sur une gamme représentative d'isolats de <i>Venturia</i> de différentes provenance géographiques.</p> <p>Le test est 100% inclusif.</p>																								
<p>Répétabilité et reproductibilité</p>	<p>La répétabilité et la reproductibilité ont été évaluées sur 10 réplicats d'une solution plasmidique calibrée, dosée à 2 concentrations proches de la LOD et, pour la répétabilité</p>																								

uniquement, sur 10 réplicats d'ADN extrait d'un échantillon de mirabellier naturellement contaminée.

Les résultats sont présentés dans le tableau ci-dessous :

		VnG8359		
		Mean Ct \pm SD ^a	CV(%) ^b	Qualitative result ^c
Repeatability	100× LOD	26,36 \pm 0,16	0,60	+
	10× LOD	29,97 \pm 0,20	0,66	+
	AI sample ^d	23,83 \pm 0,14	0,59	+
	<i>V. asperata</i> (LSVM 596)	>40 ^e	nd	-
	<i>V. pirina</i> (LSVM 601)	>40	nd	-
	<i>V. inaequalis</i> f. sp. <i>pomi</i> (LSVM 603)	>40	nd	-
	<i>V. nashicola</i> (LSVM 586)	24,94 \pm 0,16	0,64	+
Reproducibility	100× LOD	26,28 \pm 0,24	0,92	+
	10× LOD	29,67 \pm 0,33	1,10	+
	AI sample ^d	23,78 \pm 1,42	5,96	+
	<i>V. asperata</i> (LSVM 596)	>40	nd	-
	<i>V. pirina</i> (LSVM 601)	>40	nd	-
	<i>V. inaequalis</i> f. sp. <i>pomi</i> (LSVM 603)	>40	nd	-
	<i>V. nashicola</i> (LSVM 586)	24,66 \pm 0,44	1,80	+

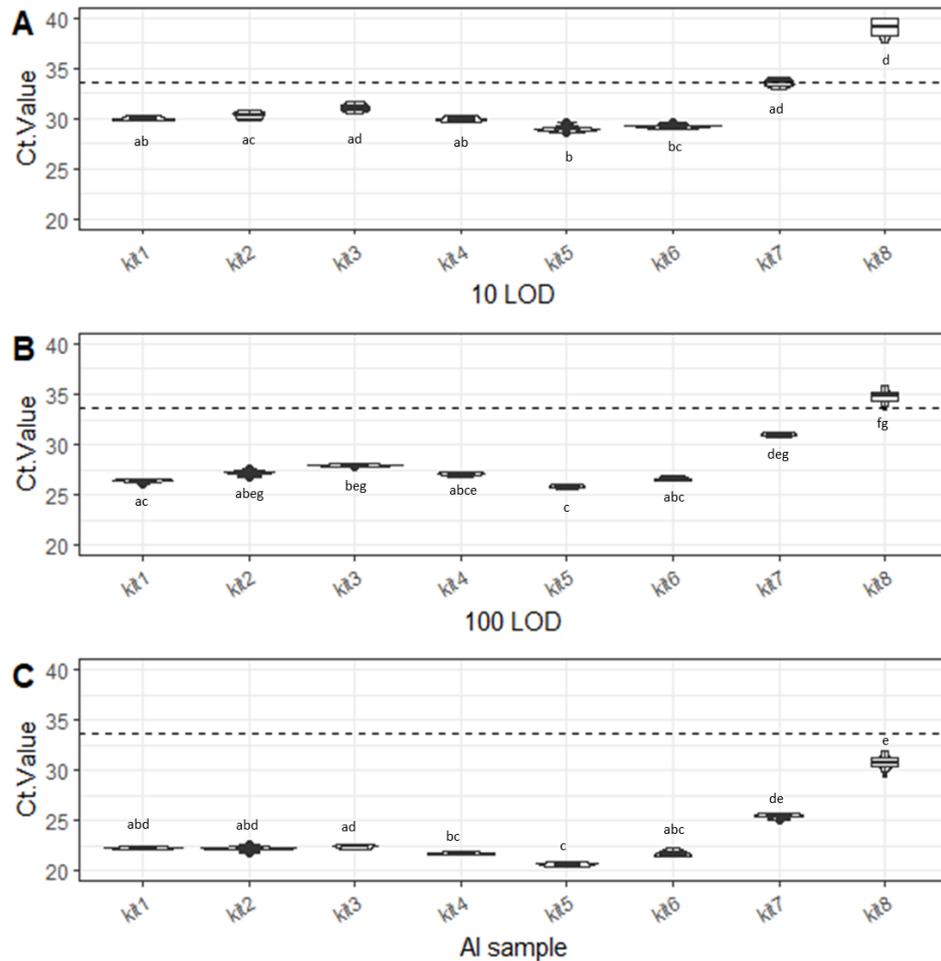
La répétabilité et la reproductibilité qualitatives sont toutes les deux à 100% et les coefficients de variation sont tous inférieurs à 10 %.

Le test est donc répétable et reproductible.

Robustesse

La robustesse a été évaluée en utilisant 10 kits d'amplification enzymatiques différents provenant de 3 fournisseurs. Pour cela, 10 réplicats d'une solution plasmidique calibrée, dosée à 2 concentrations proches de la LOD et 10 réplicats d'un échantillon artificiellement contaminé par la cible ont été utilisés.

Les résultats sont représentés sur la figure ci-dessous:



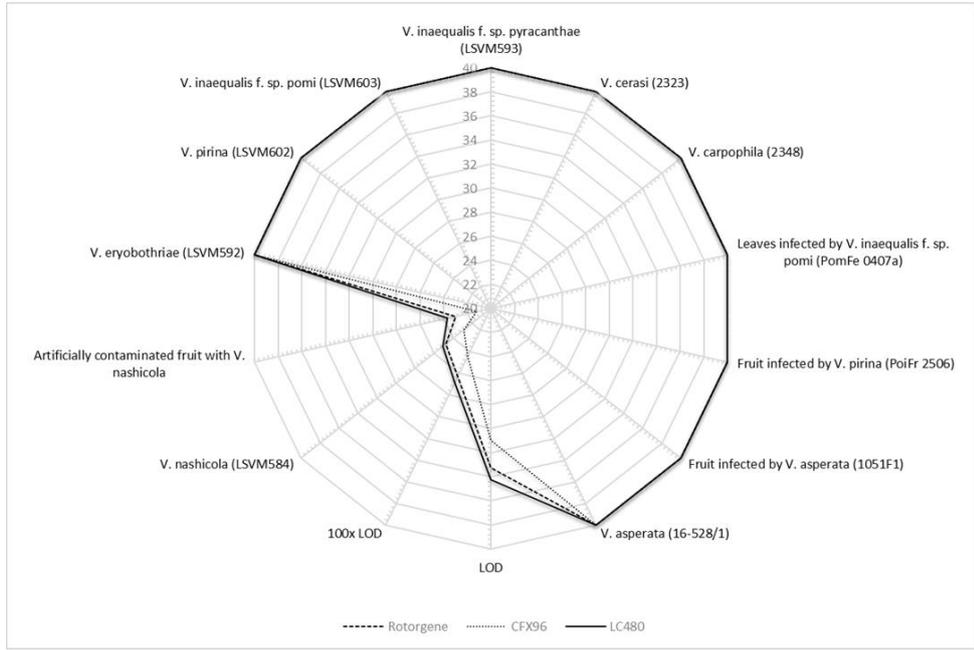
kit 1: qPCR™ Mastermix – NoRox - Eurogentec™, kit 2: Takyon™ No Rox Probe MasterMix blue dTTP - Eurogentec™, kit 3: Takyon™ Mastermix UNG - Eurogentec™, kit 4: Takyon™ Core Kit dTTP Blue - Eurogentec™, kit 5: qPCR™ Core Kit No Rox - Eurogentec™, kit 6: LightCycler® 480 Probes Master - Roche™, kit 7: LightCycler® Multiplex DNA Mastermix - Roche™, kit 8: TaqMan Universal PCR Mastermix – Applied Biosystem™

The values are the mean Ct values ± standard deviation (n=10). The dashed line represents the mean Ct value of the LOD (33.61) obtained with the reference kit (kit 1). Mean Ct values with the same letters are not different according to Kruskal-Wallis and Dunn tests, p -value<0,05.

Les kits 7 et 8 ne sont pas préconisés pour des analyses en routine dans nos conditions de travail.

Transférabilité

La transférabilité a été évaluée en utilisant trois plateformes PCR différentes (RotorGene - Qiagen, LC480 - Roche, CFX96 – Biorad). Pour cela, des échantillons naturellement contaminés par des espèces non-cibles, des cultures pures cibles et non-cibles, un échantillon cible artificiellement contaminé et des contrôles positifs plasmidiques ont été testés en triplicats sur chacune des plateformes. Les résultats sont présentés ci-dessous.



Les résultats obtenus sont concordants avec les résultats attendus : les ADN non-cibles ne sont pas amplifiés, quelle que soit la plateforme utilisée, et les ADN cibles ont tous été détectés.

Le test est donc transférable d'une plateforme PCR à l'autre.

Annexe

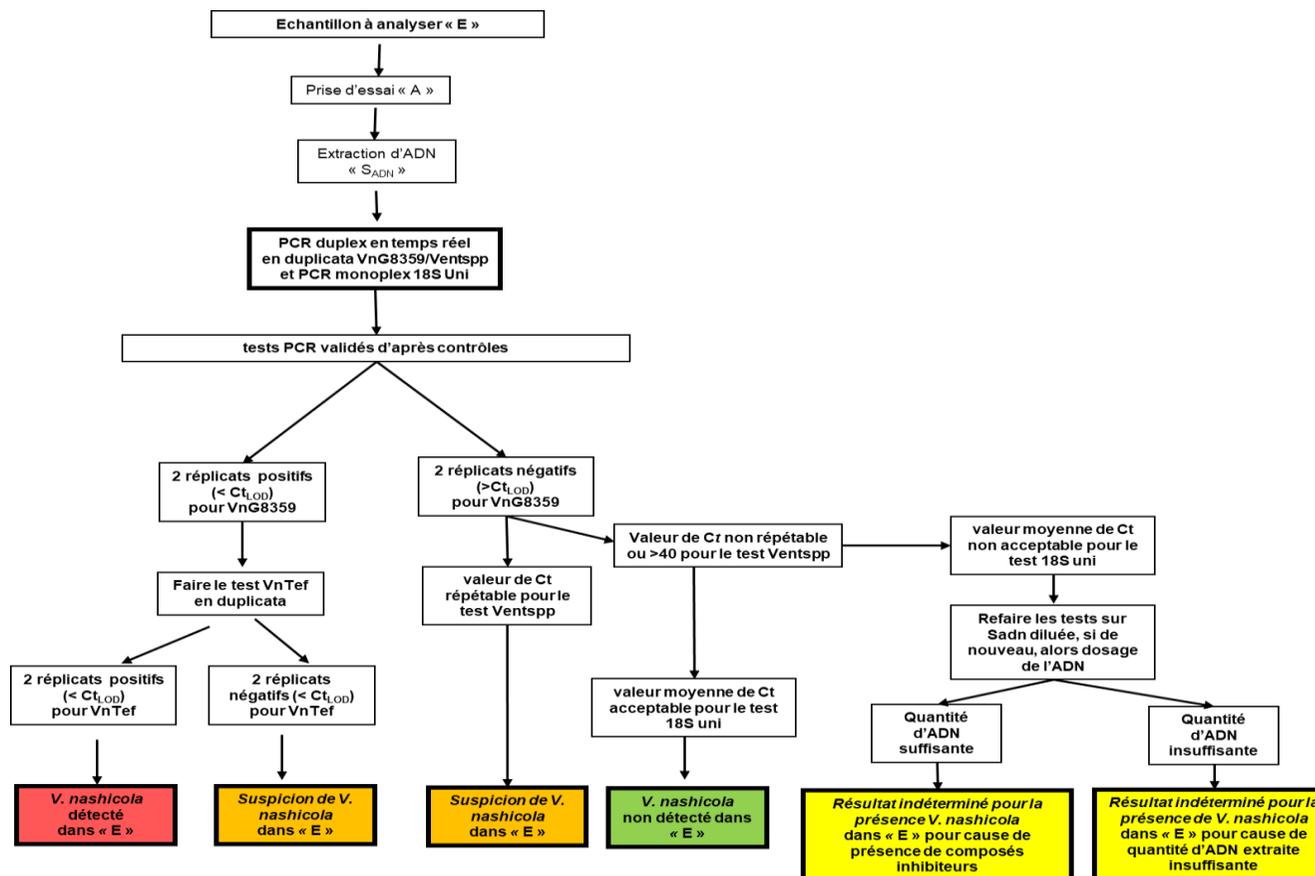


Figure 2 : Diagramme décisionnel et formulation du résultat

Bibliographie

- Ioos, R., C. Fourrier, G. Iancu & T. R. Gordon (2009) Sensitive Detection of *Fusarium circinatum* in Pine Seed by Combining an Enrichment Procedure with a Real-Time Polymerase Chain Reaction Using Dual-Labeled Probe Chemistry. *Phytopathology*, 99, 582-590.
- Muller, E., J. Shiller, B. Le Cam, Y. Laloum, M. Girault, R. Ioos & C. Guinet (2024) Species-specific real-time PCR assays for the detection of *Venturia* on apple and pear, including the quarantine species *V. nashicola*. *Journal of Plant Pathology*, In press, DOI: 10.1007/s42161-024-01615-1