

Méthode d'analyse en santé des végétaux

RÉFÉRENCE : ANSES/LSV/MA071- Version 02

Consultation

# Identification de *Meloidogyne chitwoodi*, *Meloidogyne fallax* et *Meloidogyne enterolobii* par analyse morphobiométrique et biomoléculaire

**Laboratoire de la santé des végétaux, Unité de nématologie**

**Laboratoire national de référence « Nématodes phytopathogènes\* »**

\*tous nématodes sauf exceptions mentionnées dans l'arrêté ministériel en vigueur désignant les laboratoires nationaux de référence dans le domaine de la santé publique phytosanitaire

## 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
NS04/07		04/11/2003 – Mai 2014	Version initiale
MOA024 partie C V1		Mars 2014	Version en consultation publique
MOA024 partie C V1a		Mai 2014 – Septembre 2023	
ANSES/LSV/ MA071 v1	majeure	Septembre 2023 -	<p>Ajout de l'identification de <i>M. enterolobii</i> au protocole déjà existant. Utilisation des tests moléculaires Kiewnick <i>et al.</i> (2015) et Wishart <i>et al.</i> (2002).</p> <p>Révision des étapes de détection et identification morphobiométrique basées sur les données bibliographiques.</p> <p>L'obtention du résultat final repose sur l'identification moléculaire sauf dans le cas où les individus sont en trop mauvais état pour obtenir de l'ADN amplifiable</p>
ANSES/LSV/ MA071 v2	mineure	Septembre 2024	<p>Précisions apportées à la préparation de l'observation microscopique des femelles au §8.3.2.2.</p> <p>Rectification d'erreurs de transcription des durées d'élongation des cycles JMV et JMVtrop (Wishart <i>et al.</i>, 2002) et de la durée d'élongation finale pour le test spécifique <i>M. enterolobii</i> (Kiewnick, 2015).</p> <p>Précisions apportées :</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>-sur l'analyse d'individu unique et</li> <li>-en cas de résultats « <i>M. tropicaux</i> détectés » avec JMVtrop lors de l'analyse de plusieurs individus.</li> </ul>

La version 2 de la méthode MA071 a fait l'objet d'une consultation du **XX/XX/2024 au XX/XX/2024** sur le site internet de l'agence, notamment auprès des laboratoires agréés français.

## Avant-propos

La présente méthode a été optimisée et validée par :

**Anses - Laboratoire de la santé des végétaux – Unité de nématologie**

Laboratoire National de Référence : « **Nématodes phytopathogènes\*** »

Adresse : Domaine de la Motte au Vicomte, BP 35327, 35653 LE RHEU Cedex, France

Contact : [rennes.lsv@anses.fr](mailto:rennes.lsv@anses.fr)

\*tous nématodes sauf exceptions mentionnées dans l'arrêté ministériel en vigueur désignant les laboratoires nationaux de référence dans le domaine de la santé publique phytosanitaire

## Sommaire

<b>1. Introduction</b> .....	<b>6</b>
<b>2. Avertissements et précautions de sécurité</b> .....	<b>7</b>
<b>3. Objet et domaine d'application</b> .....	<b>8</b>
3.1. Objet.....	8
3.2. Domaine d'application .....	8
3.3. Documents de référence .....	8
3.4. Termes, sigles et définitions .....	8
<b>4. Principe de la méthode</b> .....	<b>9</b>
<b>5. Consommables et réactifs</b> .....	<b>10</b>
5.1. Analyse morphobiométrique .....	10
5.2. Analyse biomoléculaire.....	10
5.2.1. Tampon d'extraction.....	10
5.2.2. Mastermix commercial, Taq polymerase et désoxyribonucléotides triphosphates (dNTPs) .....	11
5.2.3. Oligonucléotides .....	11
5.2.4. Consommables divers.....	12
<b>6. Appareillage et matériels</b> .....	<b>12</b>
6.1. Identification morphobiométrique.....	12
6.2. Identification biomoléculaire .....	13
<b>7. Échantillons</b> .....	<b>13</b>
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.....	13
<b>8. Mode opératoire</b> .....	<b>14</b>
8.1. Vérification du genre.....	14
8.2. Répartition des individus pour l'analyse morphobiométrique et biomoléculaire.....	15
8.3. Identification morphobiométrique.....	16
8.3.1. Principe.....	16
8.3.2. Mode opératoire détaillé.....	16
8.3.2.1. Prise d'analyse .....	16
8.3.2.2. Montage des préparations microscopiques.....	16

8.3.2.3. Observation microscopique à fort grossissement.....	18
8.3.2.4. Résultat de l'analyse morphobiométrique .....	25
8.4. Identification par amplification génique .....	26
8.4.1. Schéma de mise en œuvre des tests PCR.....	26
8.4.2. Contrôles et témoins .....	27
8.4.3. Extraction d'ADN.....	27
8.4.4. Amplification d'ADN .....	28
8.4.4.1. Tests PCR spécifiques .....	28
8.4.4.2. PCR universelle.....	31
8.4.5. Électrophorèse.....	32
8.4.6. Résultats.....	32
8.4.7. Interprétation des résultats de l'analyse biomoléculaire .....	33
<b>9. Interprétation et formulation du résultat de l'analyse biomoléculaire .....</b>	<b>35</b>
<b>10. Interprétation et formulation du résultat final pour un échantillon .....</b>	<b>36</b>
<b>11. Caractéristiques de performance de la méthode.....</b>	<b>38</b>
<b>12. Bibliographie.....</b>	<b>40</b>

## 1. Introduction

Les nématodes du genre *Meloidogyne*, dont les espèces *Meloidogyne chitwoodi*, *M. fallax* et *M. enterolobii*, sont des nématodes phytoparasites polyphages. Ces nématodes ont la particularité de former des galles sur les racines et tubercules des végétaux qui peuvent entraîner d'importantes altérations du système racinaire. Les conséquences sont une diminution de la croissance végétale, des jaunissements, des flétrissements entraînant une baisse de rendement.

Ces trois espèces de *Meloidogyne* sont considérées comme des parasites majeurs.

*M. chitwoodi* et *M. fallax*, sont présents en Europe et sont considérées comme des espèces de nématode les plus nuisibles dans cette région en raison de leurs larges gammes d'hôtes (Karssen 2002) composée de nombreuses familles végétales (den Nijs 2004). Elles incluent notamment les légumes racines, la tomate et beaucoup d'autres plantes cultivées de la famille des solanacées. Ces nématodes peuvent se reproduire par parthénogénèse (Castagnone-Sereno 2006) rapidement et massivement. Une fois le stade adulte atteint, les femelles deviennent sédentaires et s'alimentent via une cellule géante formant une galle sur les racines ou tubercules.

*M. enterolobii* est présent majoritairement dans des pays de l'hémisphère sud tout en étant présent sur tous les continents, excepté en Antarctique (OEPP 2023). En Europe, cette espèce est présente en conditions naturelles au Portugal et sous serre en Suisse. De plus de nombreux pays européens, dont la France, font état de signalements d'interceptions de végétaux parasités. Cette espèce est considérée comme particulièrement agressive (OEPP 2016). Le développement de femelles dans des galles est similaire à celui de *M. chitwoodi* et *M. fallax* décrit ci-dessus.

La présente méthode est basée sur la méthode MOA020 partie C qui décrivait l'identification de *Meloidogyne chitwoodi* et *Meloidogyne fallax* par analyse morphobiométrique couplée à des analyses moléculaires basées sur le test de PCR conventionnelle développé par Wishart *et al.* (2002), puis, en cas de résultat positif (*M. chitwoodi* détecté et/ou *M. fallax* détecté), la mise en œuvre du test en PCR temps réel développé par la société Clear®detection pour confirmer le résultat.

La méthode ANSES/LSV/MA071 a permis d'inclure l'espèce *M. enterolobii* dans le périmètre de cette méthode. L'identification de cette espèce de *Meloidogyne* implique une observation morphobiométrique couplée à une analyse moléculaire basée sur le test de PCR temps réel décrit dans Kiewnick *et al.* (2015) et/ou le test PCR conventionnelle décrit par Wishart *et al.* (2002).

## 2. Avertissements et précautions de sécurité

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

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

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

### 3. Objet et domaine d'application

#### 3.1. Objet

Cette méthode a été développée pour identifier les nématodes *Meloidogyne chitwoodi*, *M. fallax* et *M. enterolobii* à partir d'extraits issus de sols, racines, bulbes, tubercules ou rhizomes qu'ils soient recherchés individuellement ou en mélange, par analyses morphobiométrique et biomoléculaire au deuxième stade larvaire (stade L2), et aux stades adultes (mâle et femelle).

#### 3.2. Domaine d'application

##### Objets susceptibles d'être soumis à analyse.

Les échantillons analysés sont des nématodes isolés en laboratoire à partir d'extraits issus de sols, racines, bulbes, tubercules ou rhizomes. Les nématodes isolés peuvent être des larves infectieuses (stade L2), des femelles, des mâles ou des formes renflées de *Meloidogyne sp.*

#### 3.3. Documents de référence

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

MOA-REP 001 : Répertoire des recettes en vigueur au LNPV

Rapport « Evaluation d'un outil de PCR temps réel pour l'identification de *Meloidogyne chitwoodi* et/ou *M. fallax* sur individus isolés. Avril 2014

Rapport de caractérisation et de validation d'une méthode d'analyse « Méthode d'identification de *Meloidogyne enterolobii* sur individus isolés par PCR temps réel ». Septembre 2023

Rapport de caractérisation et de validation d'une méthode d'analyse « Evaluation des outils de PCR conventionnelle pour l'identification de *M. chitwoodi* et *M. fallax* sur individus isolés – septembre 2010

#### 3.4. Termes, sigles et définitions

Afin d'éviter toute mauvaise 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...).

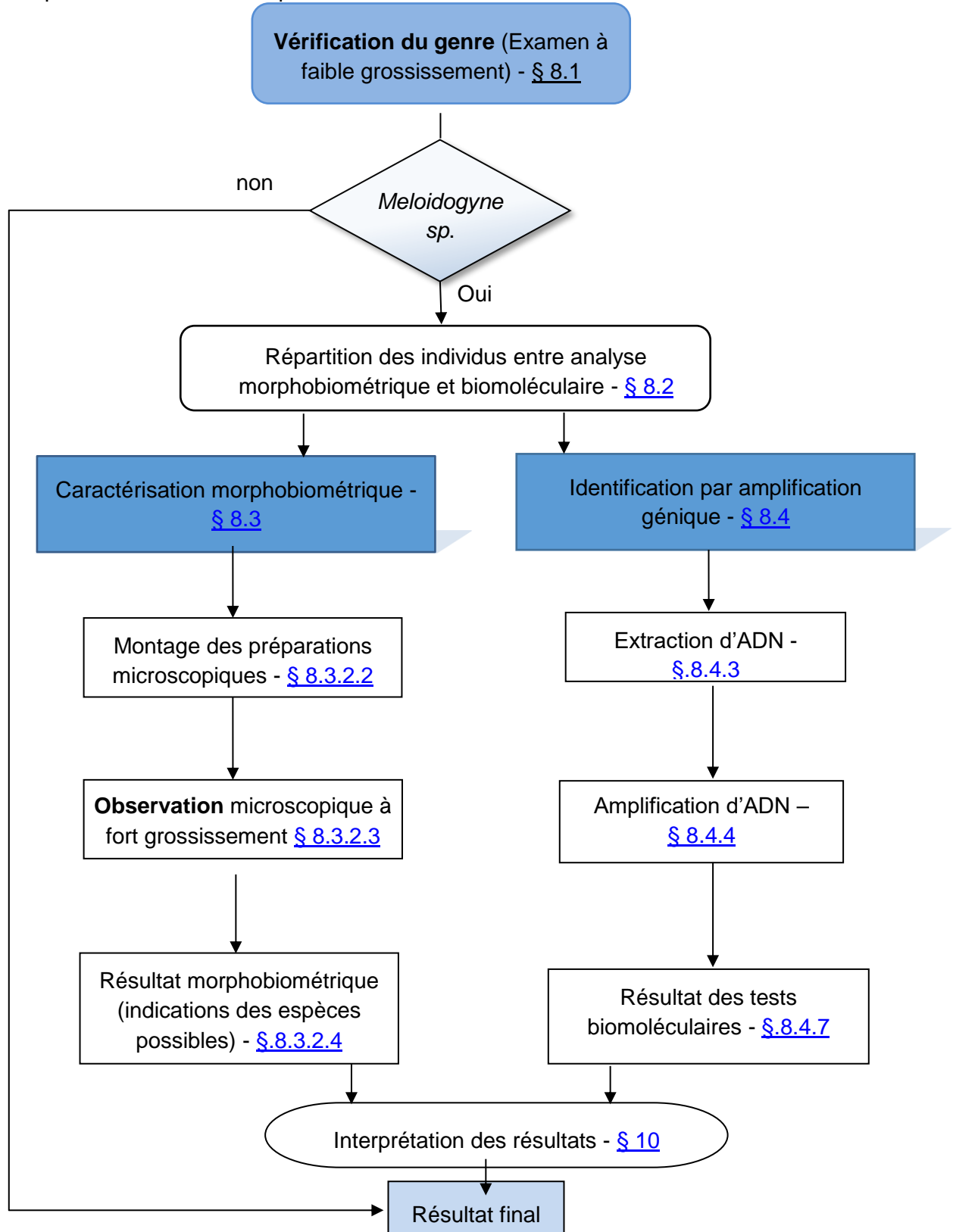
Le glossaire MOA GLO 001 reprend les principales définitions. L'attention des lecteurs est attirée sur le fait que les termes intégrés au glossaire ne sont, en règle générale, pas spécifiquement repérés dans le corps de la méthode d'analyse.

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



## 4. Principe de la méthode

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



## 5. Consommables et 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 à propriétés équivalentes peuvent être utilisés s'il est démontré qu'ils conduisent aux mêmes résultats.

### 5.1. Analyse morphobiométrique

- ✓ Cellule de lecture,
- ✓ Instrument adapté pour la manipulation et la collecte des nématodes filiformes (cil monté sur une baguette, aiguille d'acupuncture ou autre ...),
- ✓ Pinceau fin ou tout autre instrument adapté pour la manipulation et la collecte des nématodes renflés,
- ✓ Micro-scalpel ou aiguille de seringue,
- ✓ Huile d'immersion,
- ✓ Lames porte-objet et lamelles couvre-objet,
- ✓ Pissette d'eau courante,
- ✓ Platine chauffante ou autre source de chaleur diffuse,
- ✓ Vernis, lut.

### 5.2. Analyse biomoléculaire

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 optimales.

#### 5.2.1. Tampon d'extraction

D'après Ibrahim *et al.*, 1994 : Tris HCl 10mM pH=8,0 ; EDTA 1mM ; Nonidet P40 1% ; protéinase K 100µg/mL de tampon final.

Tout autre kit ou protocole d'extraction d'ADN peut être utilisé dès lors qu'il donne des résultats au moins équivalents à ceux obtenus avec le tampon d'extraction préconisé.

### 5.2.2. Mastermix commercial, Taq polymerase et désoxyribonucléotides triphosphates (dNTPs)

Les consommables validés, le mastermix et la Taq polymerase utilisés pour la validation des tests PCR sont les suivants :

Pour les PCR temps réel :

- Le pré-mix LightCycler® 480 Probes Master (réf : 04707494001 ou 04887301001) de la société Roche Diagnostics ou
- Le pré-mix LightCycler® 480 SYBR green Master (réf : 04707516001 ou 04887352001) de la société Roche Diagnostics suivant le test mis en œuvre.

Pour les PCR conventionnelles : Taq MP Biomedical (ref. EPTQD925).

D'autres mélanges réactionnels prêts à l'emploi et contenant certains réactifs nécessaires à la réalisation de master mix de PCR (tampon de polymérase, polymérase à ADN, dNTP, MgCl<sub>2</sub>, etc.) peuvent être utilisés sous réserve de démontrer préalablement qu'ils permettent d'obtenir, pour cette méthode, des niveaux de performances au moins équivalents à ceux qui sont cités au § 11. Caractéristiques de performance de la méthode.

Les quatre dNTPs (dATP, dCTP, dGTP, dTTP) peuvent être déjà intégrés dans un Mastermix commercial.

### 5.2.3. Oligonucléotides

Tableau 1 : Séquences des amorces et sonde

Cible	Référence bibliographique	Amorces et sonde	Séquences 5'→3'
<i>M. chitwoodi</i> <i>M. fallax</i>	Wishart <i>et al.</i> (2002)	JMV1 JMV2	GGA TGG CGT GCT TTC AAC TTT CCC CTT ATG ATG TTT ACC C
	Test Clear®Detection	Amorces Clear®Detections <i>M. chitwoodi</i> Amorces Clear®Detections <i>M. fallax</i>	Les séquences des amorces ne sont pas publiées ; des solutions prêtes à l'emploi peuvent être commandées auprès de la société Clear®Detections*
<i>M. enterolobii</i>	Kiewnick <i>et al.</i> (2015)	Ment 17F Ment 17R Ment 17S (LNA probe)	TGT GTT GGC TCA TTT TCA TTA AAA AAC CCT AAA AAT ACC CCA AA FAM A+G+G+A+G+C+T+G BHQ1
	Wishart <i>et al.</i> (2002)	JMV1 JMV trop	GGA TGG CGT GCT TTC AAC GCK GGT AAT TAA GCT GTC A
Tous nématodes	Zijlstra <i>et al.</i> (1995)	18S 26S	TTG ATT ACG TCC CTG CCC TTT TTT CAC TCG CCG TTA CTA AGG

\* <http://www.Clear@Detections.com/en>

#### 5.2.4. Consommables divers

- ✓ Piston Pellet pour tube 1,5 mL
- ✓ Billes de 3 mm et de 1 mm
- ✓ Eau ultra pure de qualité biologie moléculaire
- ✓ Tampon de charge
- ✓ Marqueur de taille moléculaire
- ✓ Agarose qualité biologie moléculaire
- ✓ Tampon d'électrophorèse : Tris Acétate EDTA (TAE) ou Tris Borate EDTA (TBE)

## 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).

Tableau 2 : Grandeurs et EMT associées selon MOA022

Grandeur	EMT
<b>Volume</b>	Volume < 10 mL : EMT = $\pm 10\%$ ou se référer à la norme ISO 8655 (version en vigueur).
<b>Température</b>	<b>réfrigérateur</b> : 5°C et EMT = $\pm 4^\circ\text{C}$ (ou plus strict en fonction des recommandations fournisseur) <b>congélateur</b> : $\leq -10^\circ\text{C}$ ou $\leq -18^\circ\text{C}$ en fonction des recommandations fournisseur <b>thermocycleur*</b> : 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.

### 6.1. Identification morphobiométrique

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

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

## 6.2. Identification biomoléculaire

En plus de l'appareillage courant d'un laboratoire de biologie moléculaire (pipettes, bain-marie, cuves d'électrophorèse, système de prise de vue de gel d'électrophorèse, etc.), 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 et appareil de PCR temps réel.

## 7. Échantillons

### 7.1. Conditions d'acceptation des échantillons

Les échantillons sont issus des analyses de détection (LNR ou laboratoires agréés) ayant pour cible des nématodes du genre *Meloidogyne*. Les échantillons sont constitués d'individus détectés comme appartenant au genre *Meloidogyne*.

### 7.2. Conservation des échantillons avant analyse

Avant analyse morphobiométrique, les échantillons sont conservés au froid positif.

Avant analyse biomoléculaire, les échantillons conditionnés sont conservés à une température  $\leq -10^{\circ}\text{C}$ .

### 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 et ce jusqu'à la fin de l'analyse.

## 8. Mode opératoire

### 8.1. Vérification du genre

L'analyse porte sur l'ensemble des nématodes présents dans l'extrait ou des individus isolés.

1 - Transvaser la suspension à analyser dans une cellule de lecture.

2 - Rechercher le genre faisant l'objet de l'analyse (stéréomicroscope).

Les principaux critères de distinction du genre *Meloidogyne* sont :

L2 : vermiforme, longueur comprise entre 250 et 600  $\mu\text{m}$ , stylet peu visible, recouvrement œsophagien ventral, présence d'une zone claire au niveau de l'anus, queue pointue souvent fine et présentant une partie hyaline (figures 1 et 3).

Femelle : corps blanc, globuleux ou en forme de poire, taille de 295 à 4250  $\mu\text{m}$ , parfois allongé, avec un cou plus ou moins long (figure 2); selon la maturité, une masse gélatineuse contenant les œufs, à l'extérieur de la femelle, peut être présente.

Mâle : vermiforme, taille entre 700 et 1900  $\mu\text{m}$ , tête souvent proéminente, forte sclérotisation céphalique; stylet robuste de 13 à 30  $\mu\text{m}$ , recouvrement œsophagien ventral; spicules terminaux et extrémité de la queue arrondie (figure 3).

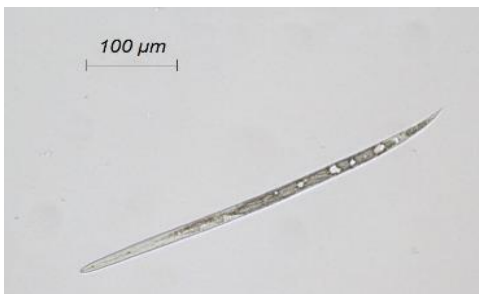


Figure 1: Larve de *Meloidogyne* sp. (© Anses - LSV)

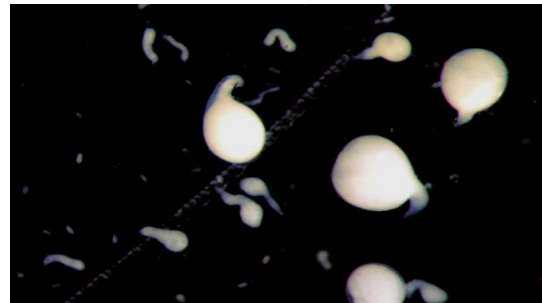


Figure 2: Femelles de *Meloidogyne* sp. (© Anses - LSV)



Figure 3: Mâle (gauche) et larve (droite) de *Meloidogyne* sp. (© Anses - LSV)

3 – **Isoler** les nématodes du genre *Meloidogyne* détectés à l'aide d'un cil, ou outil similaire, (larves et mâles) ou d'un pinceau, ou outil similaire, (femelles) et les déposer dans quelques millilitres d'eau dans un verre de montre ou tout contenant équivalent. Ils seront utilisés pour la réalisation des analyses d'identification morphologique et biomoléculaire.

## 8.2. Répartition des individus pour l'analyse morphobiométrique et biomoléculaire

Les individus préalablement isolés sont conditionnés par stade en microtubes contenant environ 100µL de tampon d'extraction pour l'identification biomoléculaire (§ 8.4).

On conditionne par tube au maximum : 10 L2 ou 5 mâles ou 1 femelle. La prise d'analyse est alors soit immédiatement soumise à extraction d'ADN, soit conservée en froid négatif jusqu'à l'extraction d'ADN. Si tous les stades sont présents dans l'échantillon, on réalise les analyses (morphologique et biomoléculaire) sur chacun d'eux. Un tube correspond à une prise d'essai.

Le tableau 3 ci-dessous décrit le nombre d'individus à répartir entre l'analyse biomoléculaire et l'analyse morphologique.

Tableau 3 : Répartition du nombre d'individus à traiter en analyse biomoléculaire et morphologique

Stades	Nombre d'individus disponibles	Nombre d'individus à analyser	
		Analyse biomoléculaire	Analyse morphobiométrique
L2	1 à 10	totalité	0
	11 à 19	10	totalité – 10
	20 et +	« totalité – 10 jusqu'à 50** »	10
Mâles	1 à 5	totalité	0
	6 et +	5	1 à 5**
Femelles	si ♀ translucides* uniquement (0 ♀ blanche)	0	5 si possible**
	1 à 4	totalité	0
Blanches	5 à 8	4	totalité – 4
	9 et +	5**	5 si possible**

\* Les femelles translucides ou partiellement translucides sont vides (ou partiellement) et ne contiennent plus ou peu d'ADN ; aucun résultat ne pourra être obtenu lors d'un test PCR.

\*\*Les valeurs indiquées sont les valeurs minimales obligatoires d'individus à analyser.

## 8.3. Identification morphobiométrique

### 8.3.1. Principe

L'analyse repose sur l'examen morphobiométrique des différents stades de développement du nématode (stade L2, femelle et mâle). Pour le genre *Meloidogyne*, ce sont les larves L2 qui apportent le plus d'informations morphobiométriques.

### 8.3.2. Mode opératoire détaillé

#### 8.3.2.1. Prise d'analyse

L'analyse porte sur un minimum de 10 larves, 5 femelles et 5 mâles par échantillon chaque fois que cela est possible.

#### 8.3.2.2. Montage des préparations microscopiques

##### Stades L2 et mâles

Déposer une goutte d'eau sur une lame.

Prélever à l'aide d'un cil les nématodes devant faire l'objet de l'identification spécifique et les déposer dans la goutte d'eau.

Placer les nématodes sur une source de chaleur (de préférence plaque chauffante à environ 60°C).

**Remarque** : cela peut se faire après avoir serti la lamelle

Contrôler la présentation des nématodes dans la goutte (disposés au centre et au fond de la goutte).

Déposer une lamelle couvre-objet sur la goutte (éventuellement, chauffer légèrement la lamelle pour éviter la condensation sur celle-ci).

Éliminer l'excès d'eau à l'aide d'un papier filtre.

Sertir la lamelle (vernis, lut, etc.).

##### Femelles

Prélever les femelles à l'aide d'un pinceau.

Déposer les femelles dans une goutte d'eau sur une plaque en plastique jetable (morceau de couvercle de boîte de Petri par exemple) ou en verre jetable (lame de microscope par exemple).

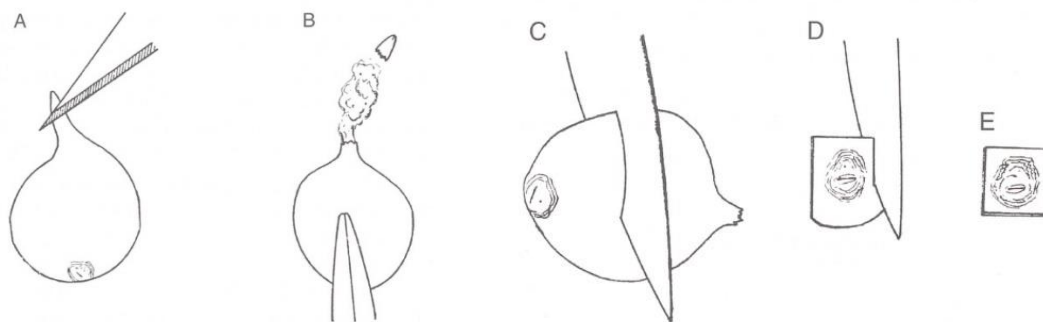
Couper la tête à l'aide d'un micro-scalpel ou d'une aiguille de seringue afin de vider le contenu de la femelle (Figure 4 A et B).



Couper l'extrémité vulvaire puis retirer progressivement des morceaux de cuticules pour se rapprocher de la zone périnéale (Figure 4 C à E).

Déposer l'extrémité vulvaires ainsi découpée dans une goutte d'eau sur une lame et contrôler la présentation (partie externe positionnée vers le haut).

Déposer une lamelle couvre-objet, éliminer l'excès d'eau et sertir.



**Figure 4 : Schéma des étapes de préparation de l'extrémité vulvaire d'une femelle adulte de *Meloidogyne* sp. pour observation microscopique (d'après Hunt & Handoo, 2009)**

### 8.3.2.3. Observation microscopique à fort grossissement

L'observation microscopique se fait sur la base de divers critères morphobiométriques dont les abréviations sont détaillées dans le tableau 4 ci-dessous et illustrée par les figures 5 à 16.

Tableau 4 : Liste des critères morphobiométriques utilisés dans ce document

<b>Abréviation</b>	<b>Signification</b>	<b>Illustration</b>
L	Longueur totale	Figure 5
W	Largeur la plus large	Figure 6
Longueur queue	Longueur de l'anus à l'extrémité de la queue	Figure 7
Longueur partie hyaline	Longueur de la partie hyaline	Figure 8
Longueur stylet	Longueur de la base des boutons basaux jusqu'à la pointe du stylet	Figure 9
Largeur boutons basaux	Largeur des boutons basaux prise perpendiculairement au stylet	Figure 9
DGO	Distance de la base des boutons basaux à l'ouverture du canal de la glande œsophagienne	Figure 10
Distance extrémité antérieur/bulbe médian	Distance de l'extrémité de la tête au début du bulbe médian	Figure 11
Distance extrémité antérieur/pore excréteur	Distance de l'extrémité de la tête au pore excréteur	Figure 12
Distance interphasmides	Distance entre les deux phasmides de la zone périnéale	Figure 13
Distance vulve/centre de l'anus	Distance entre le centre de la fente vulvaire et le centre de l'anus	Figure 14
Longueur fente vulvaire	Distance entre les deux extrémité de la fente vulvaire	Figure 15
Spicules	Longueur des spicules	Figure 16
a	Longueur totale / Largeur la plus large	-
c	Longueur totale / longueur de la queue	-

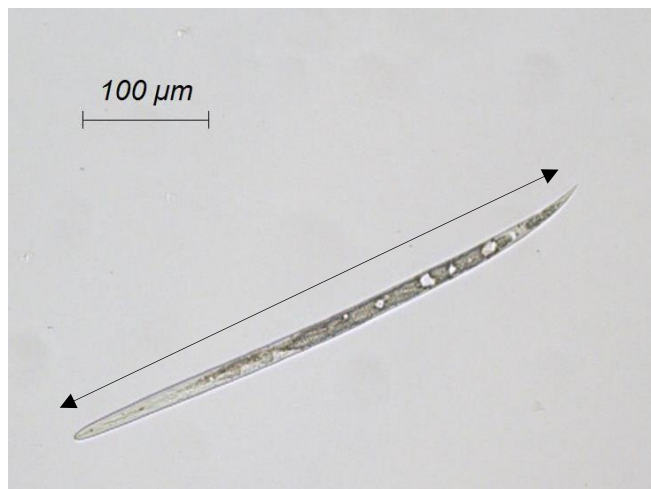


Figure 5 : Longueur totale d'une larve de stade L2 de *Meloidogyne sp.*

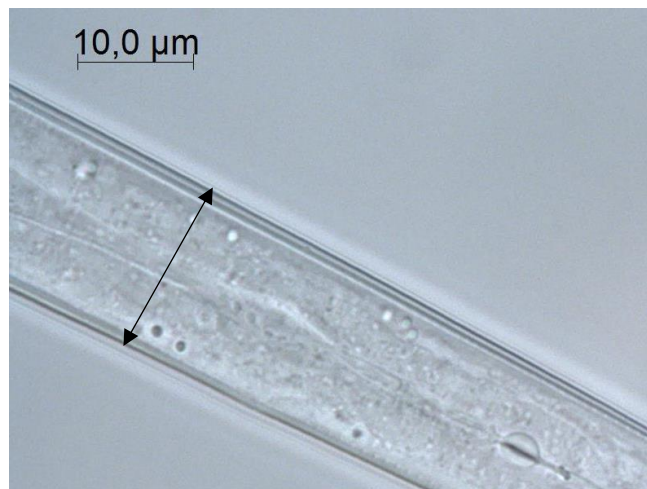


Figure 6 : Largeur la plus large d'une larve de stade L2 de *Meloidogyne sp.*

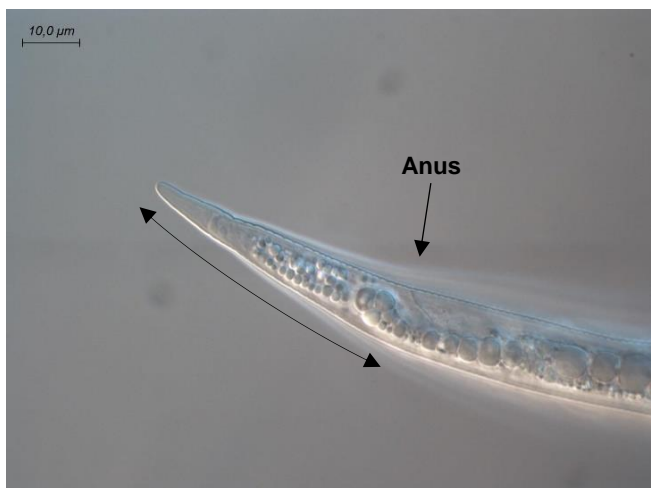


Figure 7 : Longueur de la queue d'une larve de stade L2 de *Meloidogyne sp.*

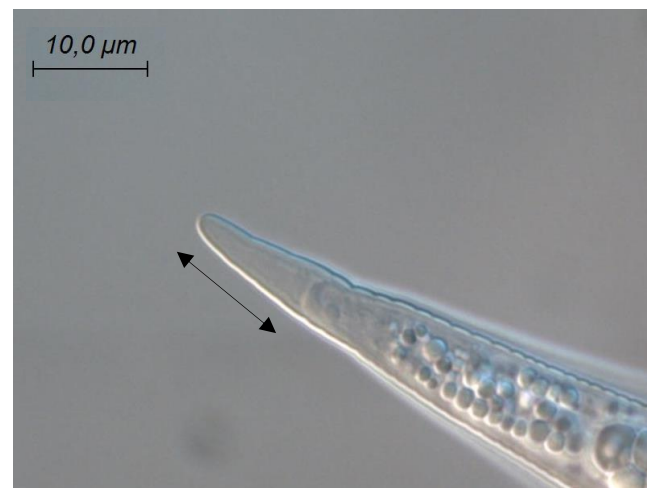


Figure 8 : Longueur de la partie hyaline d'une larve de stade L2 de *Meloidogyne sp.*

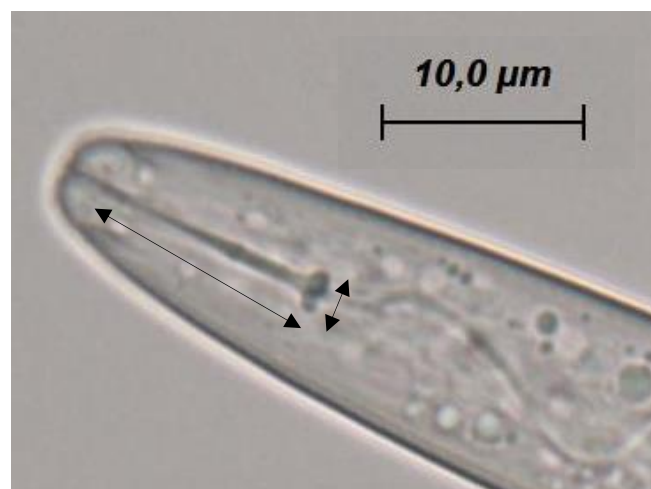


Figure 9 : Longueur du stylet et largeur des boutons basaux d'une larve de stade L2 de *Meloidogyne sp.*

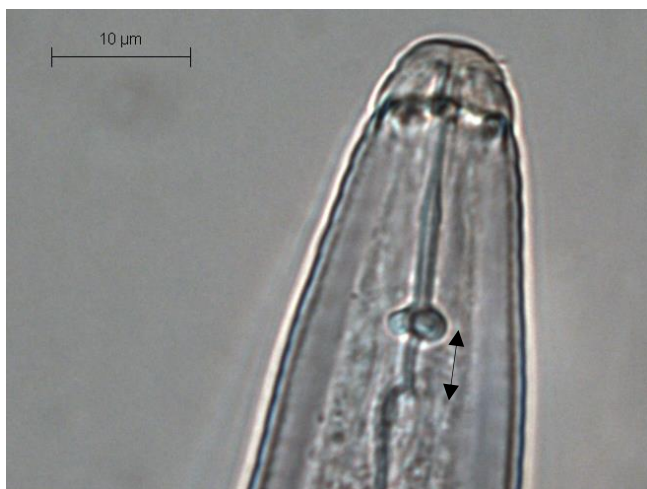


Figure 10 : DGO sur un mâle de *Meloidogyne sp.*

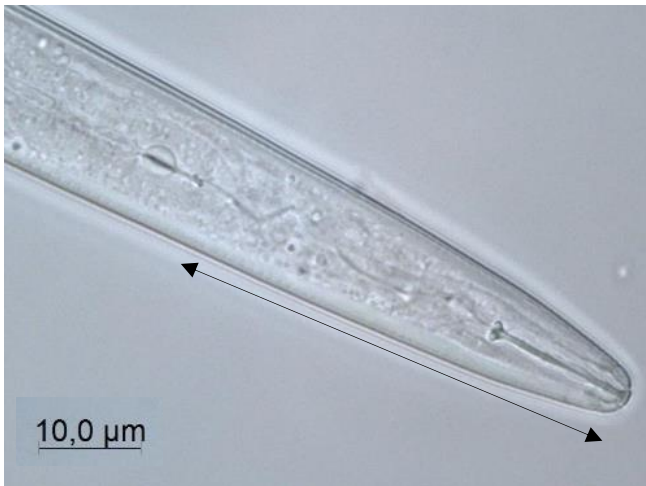


Figure 11 : Distance de l'extrémité de la tête au bulbe médian d'une larve de stade L2 de *Meloidogyne sp.*

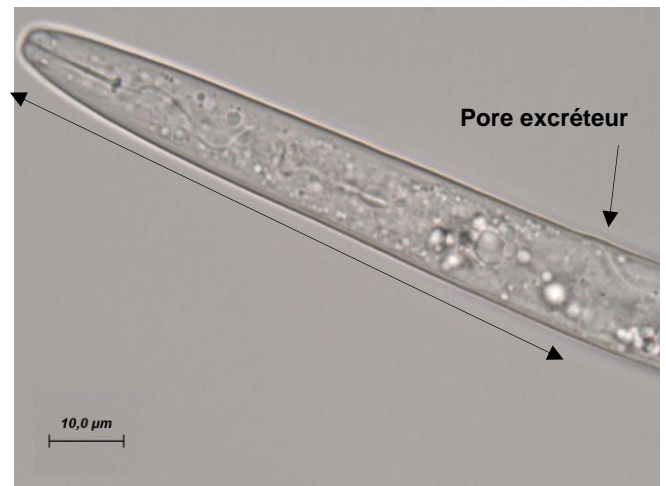


Figure 12 : Distance de l'extrémité de la tête au pore excréteur d'une larve de stade L2 de *Meloidogyne sp.*

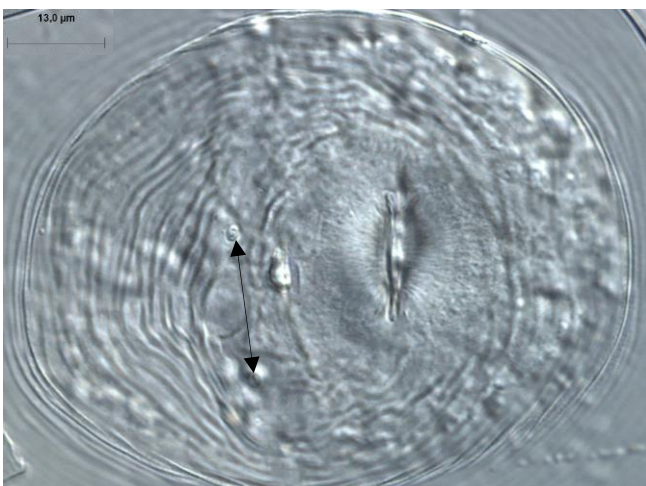


Figure 13 : Distance entre les phasmides d'une femelle de *Meloidogyne sp.*

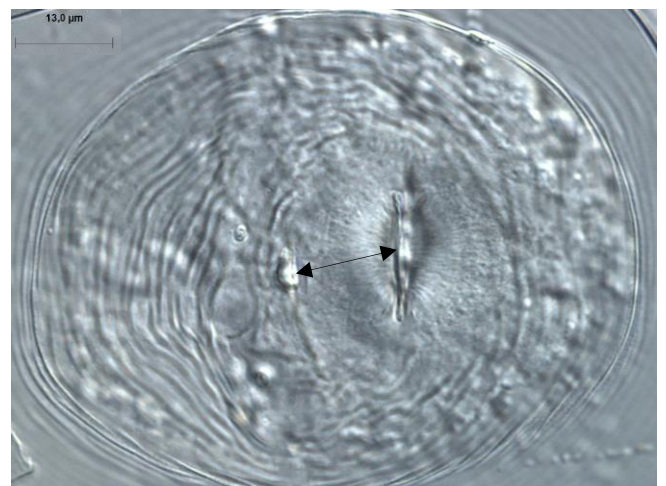


Figure 14 : Distance entre la fente vulvaire et l'anus d'une femelle de *Meloidogyne sp.*

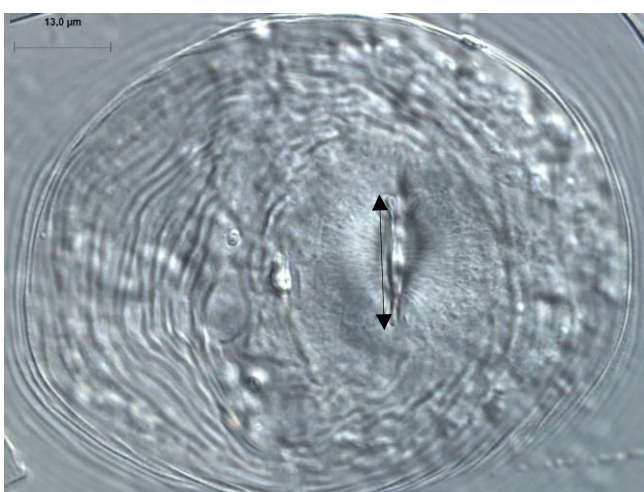


Figure 15 : Longueur la fente vulvaire d'une femelle de *Meloidogyne sp.*



Figure 16 : Longueur des spicules d'un mâle de *Meloidogyne sp.*

## Généralités

Pour chaque individu, mesurer lorsque cela est possible tous les critères morphobiométriques des tableaux 5, 6 ou 7 ci-dessous selon le stade observé. Si l'un des critères n'est pas observable, et si le nombre d'individus total de l'échantillon le permet (voir tableau 3), il est possible d'abandonner l'individu en cours et d'en observer un nouveau de façon à obtenir tous les critères morphobiométriques sur tous les individus. Toutefois, il n'est pas obligatoire de pouvoir mesurer et observer tous les critères morphobiométriques pour rendre un résultat sur l'appartenance à une espèce (ou plusieurs en cas de chevauchement des plages de mesures).

Pour chaque critère mesuré par individu, se référer aux tableaux 5, 6 ou 7 pour savoir à quelle(s) espèce(s) l'individu correspond et donner un résultat une fois tous les critères mesurés sur l'appartenance de l'individu observé à *M. chitwoodi*, *M. fallax*, *M. enterolobii*, ou une autre espèce. Il est possible d'indiquer plusieurs espèces pour un même individu ou d'indiquer *Meloidogyne sp.* si les critères mesurés semblent n'appartenir à aucune des espèces présentées dans ce document ou au contraire s'ils semblent appartenir à trop d'espèces présentées dans ce document (à cause des chevauchements des plages de mesures).

**Remarque** : il est important de conserver les mesures et photos obtenues durant le processus d'identification morphologique.

## Cas des larves de stade L2

Noter également la présence/absence de critères morphologiques tels que la forme de la queue, la présence de granules au niveau du bulbe médian, la netteté de la partie hyaline, ou toute information pouvant être pertinente. Ces informations peuvent être comparées à la littérature scientifique et permettent également d'orienter l'identification et de contribuer au résultat d'appartenance à une ou plusieurs espèces.

## Cas des femelles

Noter également la présence/absence de critères morphologiques tels que la forme et la taille générale de la zone périnéale, la présence de champs latéraux fortement marqués, la présence de granulation dans la zone de la queue, ou toute information pouvant être pertinente. Ces informations peuvent être comparées à la littérature scientifique et permettent également d'orienter l'identification et de contribuer au résultat d'appartenance à une ou plusieurs espèces ou groupes d'espèces.

## Cas des mâles

Noter également la présence/absence de critères morphologiques tels que la forme de la tête, ou toute information pouvant être pertinente. Ces informations peuvent être comparées à la littérature scientifique et permettent également d'orienter l'identification et de contribuer au résultat d'appartenance à une ou plusieurs espèces ou groupes d'espèces.

Tableau 5 : Synthèse des plages de mesures pour les critères morphobiométriques cités dans la littérature scientifique pour les larves L2 des espèces de *Meloidogyne* d'intérêt en France (adapté de EPPO,2016a et 2016b et Subbotin *et al.*, 2021)

Espèce	L	W	Longueur queue	Longueur partie hyaline	Longueur stylet	Largeur des boutons basaux	DGO	Distance extrémité antérieure/bulbe médian	Distance extrémité antérieure/pore excréteur	a	c
<i>M. chitwoodi</i>	335-422	11,5-17,1	39-51	8-13,9	9-10,7	1,7-2,5	2,1-3,9	42-57	61-84	20,8-32,7	7,2-9,6
<i>M. fallax</i>	368-435,2	13,3-16,4	46,1-55,6	12-16	10,1-11,4	1,9-2,5	3,2-3,8	44,2-54,4	63,2-77,1	23,8-40,4	6,9-8,6
<i>M. enterolobii</i>	390,4-528	13,1-17,8	41,5-64,2	5-14,7	9,2-13	NA	2,6-4,3	52,9-63,7	79,9-103,5	24-34,7	6,8-10,7
<i>M. arenaria</i>	392-605	12,8-17,8	43,6-75	8,1-19,8	10,1-15,6	1,3-2,8	2,2-5	49,4-71,2	71-105,2	22,4-40,5	6-10,9
<i>M. javanica</i>	325-515	12-16,9	35-61,5	3-18	10-16	NA	3-4,5	NA	67-86,7	24-35,9	5,8-11,1
<i>M. incognita</i>	330-593	16,6-22	38-60	6,3-16	9-17	NA	1,8-3,3	NA	58-100	16,5-41,8	6,3-12,3
<i>M. minor</i>	300-416	10-22	40-63	12-22,1	7,6-12,8	1,2-2,5	2,5-4,2	NA	58,1-77,9	17,7-32,5	6,1-7,8
<i>M. artiellia</i>	301-370	10-16,8	16-28,8	4,4-8,8	10,5-16	NA	2-4,6	NA	NA	19,7-25,7	12,3-17,2
<i>M. naasi</i>	397-487,2	13,3-18	52-89,9	15,8-32	10,8-15,2	NA	2-3,2	NA	74	24,2-32,6	5,2-8
<i>M. graminicola</i>	400-570	12-24	50-92	10,4-30	10-15,5	NA	2-5,2	NA	59-95	19-38	5,1-9,3
<i>M. hapla</i>	284-517	10-12	30-69	5-19	8-13,3	NA	2,2-2,7	NA	68,8-74	20,1-37,6	6,2-10,3

« NA » indique une absence de données

Tableau 6 : Synthèse des plages de mesures pour les critères morphobiométriques cités dans la littérature scientifique pour les femelles des espèces de *Meloidogyne* d'intérêt en France (adapté de EPPO,2016a et 2016b et Subbotin *et al.*, 2021)

Espèce	L	W	Distance interphasmides	Distance vulve/centre de l'anus	Longueur fente vulvaire
<b>M. chitwoodi</b>	430-740	344-518	NA	13-22	19-32
<b>M. fallax</b>	404,1-720,3	256,2-464,1	NA	12,6-19	20,2-28,4
<b>M. enterolobii</b>	518,4-926,3	339,2-809,7	18,1-42	12,7-26,6	20,9-32,4
<b>M. arenaria</b>	510-1000	378-791	28-31	15-25,9	18,1-32,8
<b>M. javanica</b>	490-1012,5	262-729	24,1-34,2	NA	21,5-28,1
<b>M. incognita</b>	500-1100	300-800	NA	NA	19,3-27,4
<b>M. minor</b>	332-608	199-464	NA	11,5-17,1	17-29,4
<b>M. artiellia</b>	344-760	340-460	NA	NA	14,4-22
<b>M. naasi</b>	455-705	227-398	14,1-26	23-27,5	17-25
<b>M. graminicola</b>	340-857	170-624	11-24	11-22	17,3-32
<b>M. hapla</b>	419-845	225-561	NA	NA	NA

« NA » indique une absence de données

Tableau 7 : Synthèse des plages de mesures pour les critères morphobiométriques cités dans la littérature scientifique pour les males des espèces de *Meloidogyne* d'intérêt en France (adapté de EPPO,2016a et 2016b et Subbotin *et al.*, 2021)

Espèce	L	a	c	W	Longueur stylet	Largeur boutons basaux	DGO	Distance extrémité antérieure/bulbe médian	Distance extrémité antérieure/pore excréteur	Spicules	Longueur queue
<i>M. chitwoodi</i>	860-1488	20,2-48,8	91,8-226	22-50	16-19,4	3,3-4,5	2,2-4,2	61-85	97-169	23-32	4,7-14,8
<i>M. fallax</i>	736,2-1520,1	21,2-53,5	82,7-201,7	27,2-43,8	18-21	3,8-5,1	3,2-5,7	58,8-72,7	94,8-139,9	22,1-29,7	7,6-12,1
<i>M. enterolobii</i>	782-1913,3	21,9-49,6	72-173,4	24,1-48,3	17,5-26,2	NA	3,3-6,7	71,5-116,3	117,5-229,5	NA	NA
<i>M. arenaria</i>	979-2446	24,7-63,7	76-212	25,4-47,5	17,5-28,4	2,8-6,3	2,5-7,9	64-121,3	118-213,2	21,3-39,4	9,7-19,4
<i>M. javanica</i>	757-2295	9,7-19,4	50-144	37-49,4	17-23,3	3,6-5,8	2,2-4,7	NA	NA	20,9-35,3	NA
<i>M. incognita</i>	935-2200	31-60,5	41,9-255	22,6-42,8	19-32,7	4,5-5,5	1,4-4,8	NA	117-200	21-46	NA
<i>M. minor</i>	790-1689	19,2-48,3	72,4-16,3	21,5-52	16,3-19	3,3-5,1	3,2-4,8	NA	77,9-160,3	22,8-28,7	7,4-12,6
<i>M. artiellia</i>	820-1370	34,5-41,7	60-100	23-36	15,2-27	NA	4,4-7	52-60	NA	25-30	NA
<i>M. naasi</i>	742-1316	31,1-48	NA	20,8-34,8	16-19	NA	2-4	NA	60	25-30,3	49-84
<i>M. graminicola</i>	980-2472	22-51,6	72,8-215	21,3-72,8	15-20,6	3-5	2,9-7,8	NA	58-163,8	20-36,4	6-18,2
<i>M. hapla</i>	791-1432	33,3-47	73-283	NA	17-23	2,5-3	2,5-3,5	NA	NA	20-28	NA

« NA » indique une absence de données



#### 8.3.2.4. Résultat de l'analyse morphobiométrique

Un résultat d'identification est donné pour chacun des individus observés. Plusieurs résultats différents peuvent être obtenus en cas de mélange d'espèces ou présence d'individus typiques et atypiques.

Le résultat de l'analyse morphobiométrique est une synthèse des résultats obtenus par individu.

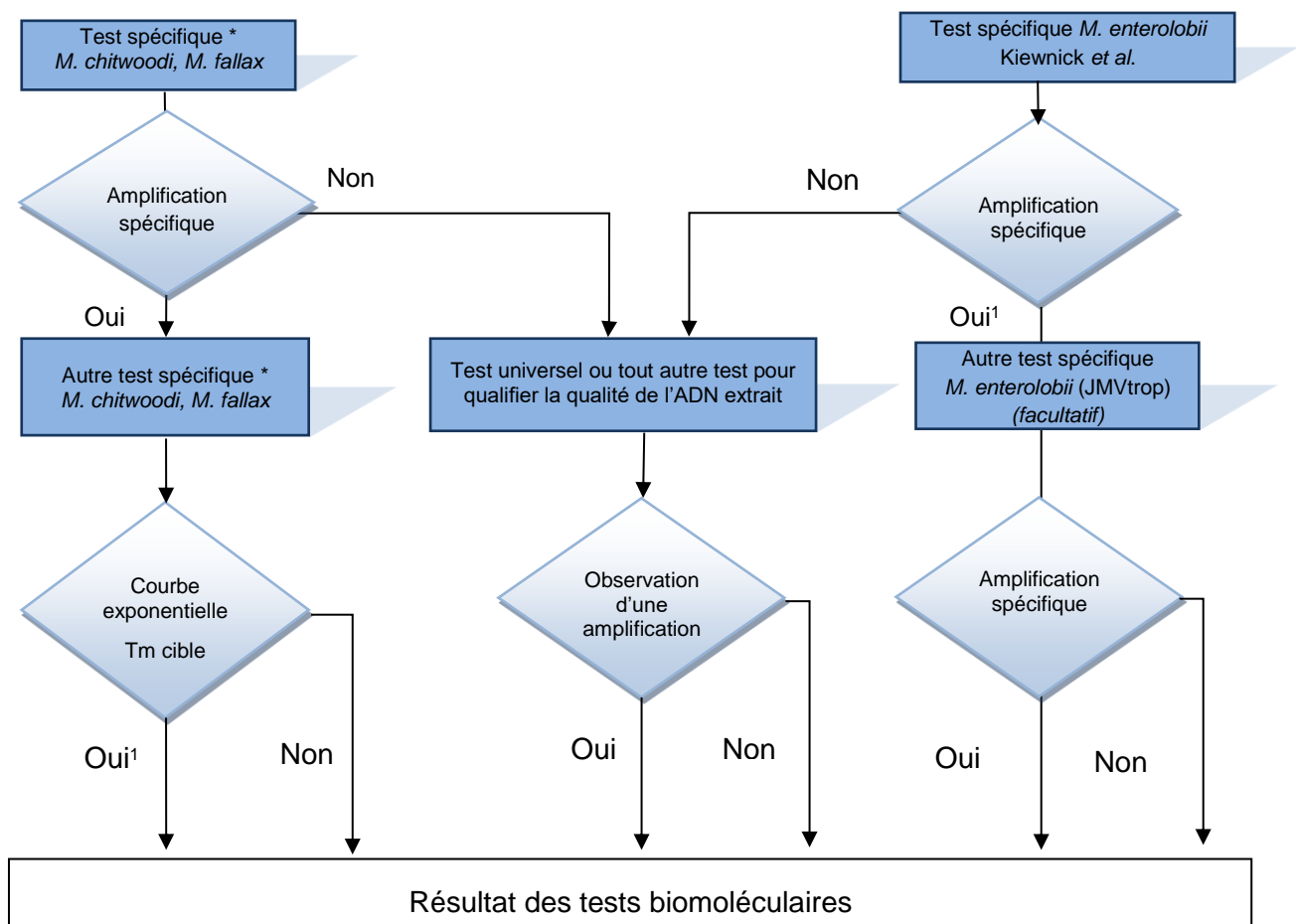
Ce résultat est destiné à orienter l'identification moléculaire. La grande variabilité observée des mesures relatives aux différents critères considérés pour l'identification ne permet pas de discriminer avec certitude les espèces du genre *Meloidogyne*. Aussi, **l'observation morphobiométrique est considérée comme une étape intermédiaire de ce mode opératoire qui n'est pas intégrée à l'obtention du résultat final pour l'identification de *Meloidogyne chitwoodi*, *M. fallax* et *M. enterolobii* excepté lorsque les individus isolés pour les analyses moléculaires ne permettent pas d'obtenir de l'ADN amplifiable.**

Toutefois, ces observations morphobiométriques restent indispensables pour appuyer convenablement les analyses moléculaires, en particulier pour détecter d'éventuels mélanges d'espèces dans les échantillons. De plus, l'analyse morphobiométrique peut également permettre d'identifier des espèces du genre *Meloidogyne*, autres que les trois espèces objets de cette méthode et celles pour lesquelles des outils moléculaires existent. Cette information pourra alors faire l'objet d'un commentaire sur le rapport final en complément du résultat obtenu pour *Meloidogyne chitwoodi*, *M. fallax* et *M. enterolobii*.

## 8.4. Identification par amplification génique

L'analyse est réalisée sur le ou les individus qui auront été prélevés et conditionnés préalablement selon les modalités décrites au § 8.2.

### 8.4.1. Schéma de mise en œuvre des tests PCR



\* : les tests spécifiques sont à mettre en œuvre en cascade indifféremment (cf §5.2.3).

<sup>1</sup> : Lors de l'analyse d'individu unique (1 mâle, 1 femelle ou 1 larve), l'identification d'une espèce dispense de réaliser les tests pour la recherche des autres espèces. Le résultat sera alors noté « non détecté » pour les espèces non identifiées.

Pour les analyses *M. chitwoodi* et *M. fallax*, dans le cas de confirmation après MOA024 partie A, il est obligatoire de réaliser le test JMV1/JMV2 en premier.

### 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 témoin négatif de processus (E-) : un tube de tampon d'extraction identique à celui utilisé pour les échantillons et dans un volume identique, traité dans les mêmes conditions que les échantillons à analyser.
- les témoins positifs de PCR (A+) : un pour chaque cible: il contient tous les éléments du mélange réactionnel, ainsi qu'un extrait d'ADN de ou des cibles recherchées; ces témoins permettent de vérifier que la réaction de PCR s'est déroulée de façon correcte et permet une amplification des échantillons contaminés.
- 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.
- un témoin négatif de spécificité (facultatif) : il contient tous les éléments du mélange réactionnel, ainsi qu'un extrait d'ADN non cible ; cela permet de vérifier l'absence de réaction croisée au cours de la réaction de PCR. Ce type de témoin n'est pas nécessaire pour le test universel.

Selon les tests PCR, les extraits d'ADN à inclure seront issus des espèces suivantes (tableau 8):

Tableau 8 : Témoins de PCR à inclure en fonction du test mis en œuvre

Témoin	PCR spécifiques		PCR universelle
	<i>M. chitwoodi</i> et <i>M. fallax</i>	<i>M. enterolobii</i>	
Témoin positif de PCR (A+)	<i>M. chitwoodi</i> et/ou <i>M. fallax</i>	<i>M. enterolobii</i>	<i>M. chitwoodi</i> ou <i>M. fallax</i> ou <i>M. enterolobii</i>
Témoin négatif de spécificité	Une espèce de <i>Meloidogyne sp.</i> autre que la ou les cibles(s).		

Ces témoins permettent de vérifier le bon fonctionnement des étapes d'extraction d'ADN et de PCR (extraction et amplification de l'ADN de la cible pour les contrôles positifs, l'absence de contamination pour les contrôles négatifs).

### 8.4.3. Extraction d'ADN

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

Pour ce faire,

#### Cas des formes filiformes :

- Ajouter des billes de verre de diamètres différents (1 bille de 3 mm et environ 100 µL de billes de 1 mm de diamètre) dans le microtube contenant les nématodes.

- Placer sous agitation pendant environ 40 secondes à une fréquence d'environ 30 coups par seconde (microtubes préalablement décongelés).

Cas des formes renflées :

- Broyer les individus préalablement conditionnés en microtubes à l'aide d'un piston.

**Puis dans tous les cas :**

- Placer les microtubes au bain-marie (entre 50 et 60°C) pendant au moins une heure, pour optimiser l'activité de la protéinase K.
- Si les ADN obtenus sont transférés en plaque pour la dénaturation de la protéinase K, centrifuger brièvement les microtubes pour précipiter les débris cellulaires et transférer le surnageant.
- Procéder à un nouveau traitement thermique des microtubes ou de la plaque après transfert des solutions d'ADN à environ 95°C pendant environ 10 min (dénaturation de la protéinase K).
- Si la dénaturation de la protéinase K a eu lieu dans les microtubes, centrifuger brièvement les microtubes pour précipiter les débris cellulaires avant de pipeter l'ADN.

#### 8.4.4. Amplification d'ADN

Chaque extrait d'ADN est testé en duplicat.

##### 8.4.4.1. Tests PCR spécifiques

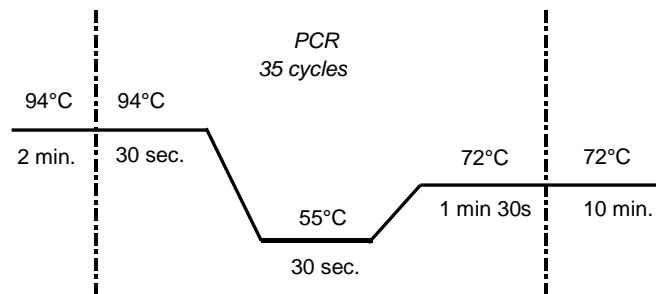
Tests d'identification *M. chitwoodi*/*M. fallax*

- JMV1/JMV2 (Wishart et al., 2002)

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

Réactifs	Test JMV1/JMV2 (Wishart <i>et al.</i> , 2002) Concentration finale par tube de réaction
Volume réactionnel total	25 µL
Tampon Taq DNA polymérase	1 X
MgCl <sub>2</sub> (prendre en compte le MgCl <sub>2</sub> éventuellement présent dans le tampon Taq)	1,5 mM
Amorces JMV1 :	0,2 µM
JMV2 :	0,2 µM
dNTPs	0,2 mM
Taq DNA polymérase	1 unité
Eau ultra pure	Qsp 20 µL
Extrait ADN	5 µL

Appliquer le programme d'amplification suivant :

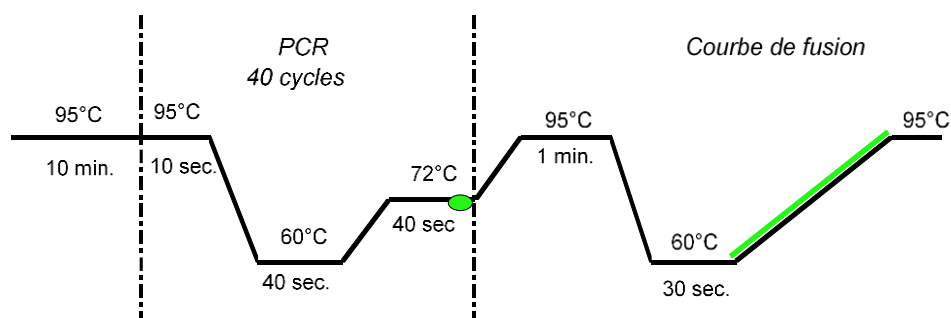


➤ Test Clear®Detections

Les tests étant des simplex, la PCR à réaliser dépend de la cible à identifier. L'amplification d'ADN est réalisée dans les conditions suivantes :

	Test Clear®Detections
<b>Réactifs</b>	<b>Concentration finale par tube de réaction</b>
Volume réactionnel total	20 µL
Mastermix SYBR Green commercial	1X
Primer mix 10X ( <i>M. chitwoodi</i> ou <i>M. fallax</i> )	1X
Eau ultra pure	Qsp 17 µL
Extrait ADN	3µL

Appliquer le programme suivant pour le LC 480 (Roche Diagnostics) :



La fluorescence du SYBR Green est mesurée ponctuellement à la fin de chaque cycle et en continu pendant la courbe de fusion (symbolisée en vert sur le programme ci-dessus).

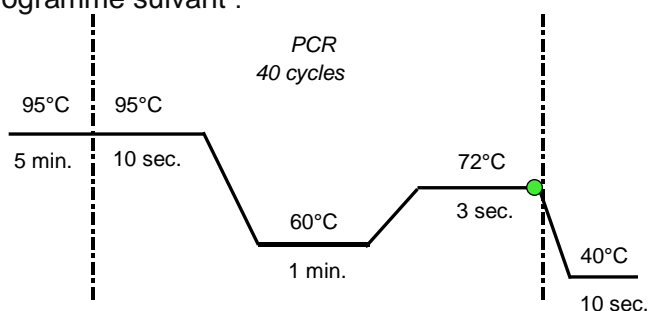
Tests d'identification *Meloidogyne enterolobii*

➤ Test PCR temps réel (Kiewnick *et al.*, 2015)

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

	<b>Test <i>M. enterolobii</i> (Kiewnick <i>et al.</i>, 2015)</b>
<b>Réactifs</b>	<b>Concentration finale par tube de réaction</b>
Volume réactionnel total	20 µL
Mastermix Probes commercial	1 X
Amorces Ment17 F :	1 µM
Ment17 R :	1 µM
Sonde Ment17 S :	0,2 µM
Eau ultra pure	Qsp 20 µL
Extrait ADN	3 µL

Appliquer le programme suivant :



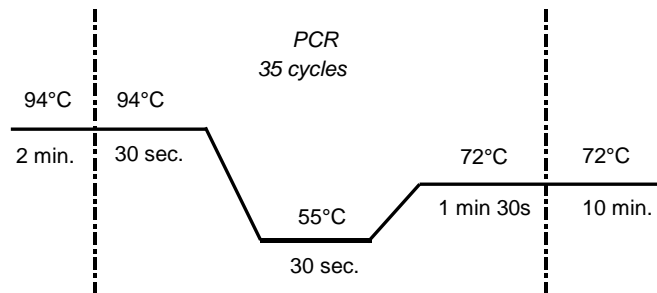
● acquisition de la fluorescence

➤ Test PCR conventionnel JMV1-JMVtrop (Wishart *et al.*, 2002)

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

	<b>Test JMV1/JMVtrop (Wishart <i>et al.</i>, 2002)</b>
<b>Réactifs</b>	<b>Concentration finale par tube de réaction</b>
Volume réactionnel total	25 µL
Tampon Taq DNA polymérase	1 X
MgCl <sub>2</sub> (prendre en compte le MgCl <sub>2</sub> éventuellement présent dans le tampon Taq)	1,5 mM
Amorces JMV1 :	0,2 µM
JMVtrop :	0,2 µM
dNTPs	0,2 mM
Taq DNA polymérase	1 unité
Eau ultra pure	Qsp 20 µL
Extrait ADN	5 µL

Appliquer le programme d'amplification suivant :



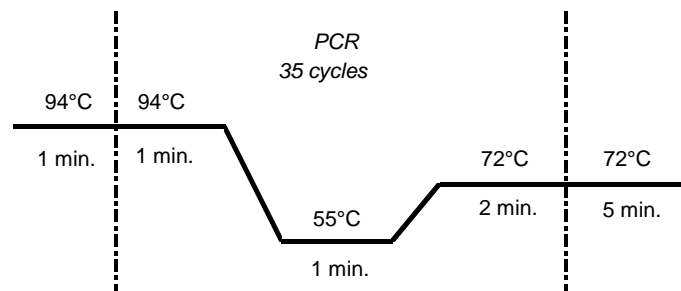
#### 8.4.4.2. PCR universelle

Ce test est réalisé lorsque les tests spécifiques ne génèrent aucune amplification ou ne génèrent pas d'amplification correspondant aux cibles recherchées (voir logigramme décisionnel présenté dans le point 8.4).

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

	Test 18S-26S (Zijlstra <i>et al.</i> , 1995)
<b>Réactifs</b>	<b>Concentration finale par tube de réaction</b>
Volume réactionnel total	30 µL
Tampon Taq DNA polymérase	1 X
MgCl <sub>2</sub> (prendre en compte le MgCl <sub>2</sub> éventuellement présent dans le tampon Taq)	1,5 mM
Amorces 18S	0.6 µM
26S	0.6 µM
dNTPs	0.1 mM
Taq DNA polymérase	0,6 unité
Eau ultra pure	Qsp 25 µL
Extrait ADN	5 µL

Appliquer le programme d'amplification suivant :



Dans le cas des tests par PCR conventionnelle (JMV1/JMV2, JMV1/JMVtrop et test universel), réaliser les opérations décrites dans le paragraphe 8.4.5.

### 8.4.5. Électrophorèse

Préparer un gel d'agarose entre 1,5 et 2% environ 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 dans le bain de révélation.

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.

#### Révélation :

La révélation est réalisée après immersion dans une solution de marqueur d'ADN (par exemple, le bromure d'éthidium, BET, est souvent utilisé comme marqueur à la concentration de 1 µg/mL). Si le marqueur d'ADN était présent dans le gel au départ, passer directement à l'étape suivante.

Observer le gel sous UV.

Remarques : veiller à la protection des utilisateurs contre les UV (yeux, peau), le BET ou tout autre marqueur d'ADN. 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.

#### Conservation des résultats :

L'observation de gel sous U.V. ne constitue pas un moyen suffisant pour garantir la traçabilité des résultats. Un équipement adapté fournissant une copie /image fidèle du gel sur un support stable dans le temps et référencé est nécessaire.

### 8.4.6. Résultats

Pour tous les tests PCR, l'analyse est validée si les conditions ci-dessous sont vérifiées :

Tableau 9 : Conditions de validation des analyses

Type de contrôle	Résultat attendu et devant être observé
Contrôle négatif de processus	<b>NÉGATIF</b>
Contrôle négatif de PCR	<b>NÉGATIF</b>
Contrôle(s) positif(s) de PCR	<b>POSITIF(S)</b>
Contrôle négatif de spécificité (sauf PCR tous nématodes)	<b>NÉGATIF</b>



### 8.4.7. Interprétation des résultats de l'analyse biomoléculaire

L'interprétation s'entend par prise d'essai.

#### Pour la PCR conventionnelle :

L'analyse est qualitative. Quel que soit le test PCR, le résultat d'un puits est :

- négatif lorsqu'aucune amplification n'est observée,
- négatif lorsqu'aucune amplification à la taille attendue n'est observée,
- positif lorsqu'un fragment de taille attendue est observé.

#### Pour la PCR temps réel :

Les résultats obtenus par PCR temps réel sont traités par une analyse automatique du logiciel. Une analyse de type quantitative permet de déterminer le *crossing-point* (ou *Cp*) des produits amplifiés.

Pour qu'une prise d'essai soit considérée comme positive, son *Cp* doit être inférieur à une valeur de cut off définie à 35 dans les conditions d'analyse du LNR, la courbe d'amplification doit être de type exponentiel. Le *Tm* doit être interprété selon le tableau 10 ci-dessous s'il y a lieu (test Clear®Detection).

Les tailles de fragments attendues pour les PCR conventionnelles et l'interprétation des PCR temps réel sont résumées dans le tableau 10:

Tableau 10 : Résultats attendus par test PCR et par cible

Cible \ PCR	Tests <i>M. chitwoodi</i> / <i>M. fallax</i>		Test <i>M. enterolobii</i>		PCR « tous nématodes »
	JMV1/JMV2	Clear®Detection	Kiewnick	JMV1/JMVtrop	
<i>M. chitwoodi</i>	540pb	Cp<35 et Tm 82.6*+/-1°C	/	/	
<i>M. fallax</i>	670pb	Cp<35 et Tm 82.8*+/-1°C	/	/	
<i>M. enterolobii</i>	/	/	Cp<35	600, 350 et 220pb	
<i>M. sp.</i>	/	/	/	/	Environ 760pb

\*: Valeurs indicatives obtenues dans les conditions d'amplification du LNR

Le résultat d'un test PCR est obtenu en suivant les indications mentionnées dans les tableaux suivants :

**Pour les PCR spécifiques :**

Analyse d'une prise d'essai		Résultat du test
Puits 1	Puits 2	
+	+	POSITIF
+	-	PCR à refaire. Si au moins 1 positif sur 2 lors de la 2 <sup>ème</sup> amplification, le résultat est interprété comme positif.
-	-	NÉGATIF, test PCR universelle à réaliser ou tout autre test générant une amplification

**Remarque :**

- pour les PCR conventionnelles, + et - correspondent respectivement à la présence et à l'absence du fragment d'amplification à la taille attendue.
- pour les PCR temps réel :
  - + : observation d'une courbe d'amplification exponentielle avec une valeur de  $C_p < 35$  (et avec un  $T_m$  correspondant à la cible recherchée pour *M. chitwoodi* et *M. fallax*).
  - : absence de courbe d'amplification exponentielle avec une valeur de  $C_p < 35$  ou pour *M. chitwoodi* et *M. fallax* : observation d'une courbe d'amplification exponentielle avec une valeur de  $C_p < 35$  mais avec un  $T_m$  différent de celui de la cible recherchée.

Les laboratoires détermineront les  $T_m$  et  $C_p$  de chaque test PCR temps réel pour chaque couple thermocycleur / pré-mix commercial.

**Pour la PCR universelle 18S-26S :**

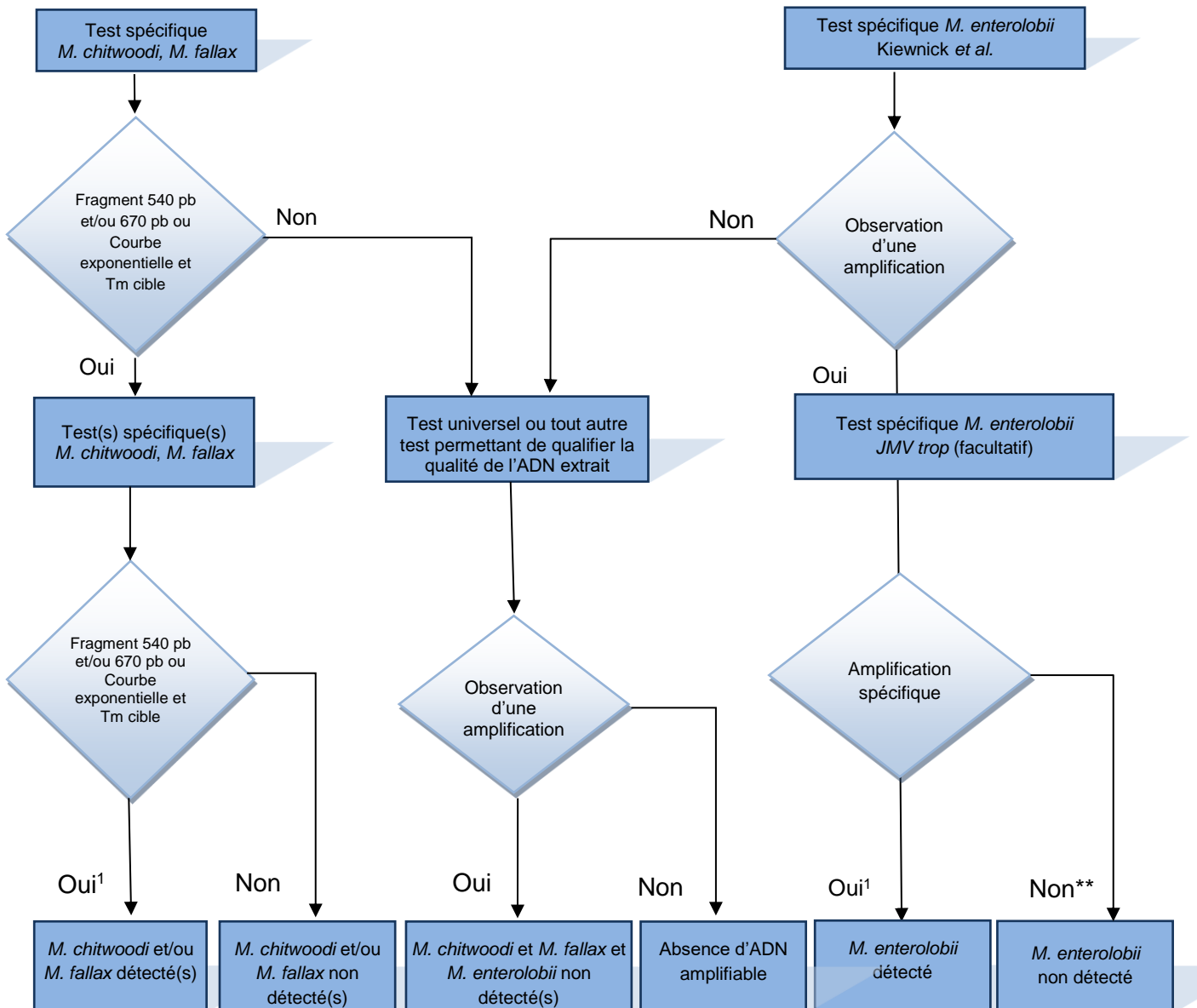
Analyse d'une prise d'essai		Résultat du test
Puits 1	Puits 2	
+	+	POSITIF
+	-	POSITIF
-	-	NÉGATIF

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

## 9. Interprétation et formulation du résultat de l'analyse biomoléculaire

Le résultat de l'analyse biomoléculaire est une synthèse des résultats obtenus par microtube analysé.

L'interprétation des résultats de l'analyse biomoléculaire est réalisée en suivant le logigramme ci-après :



\*\* : si l'analyse porte sur un mélange d'individus, seul le résultat du test Kiewnick est pris en compte en cas de résultat positif « *Meloidogyne* tropicaux détectés » avec le test JMVtrop (cf. §11 : Synthèse des résultats de l'évaluation d'outils d'identification de *M. enterolobii* par PCR).

<sup>1</sup> : Lors de l'analyse d'individu unique (1 mâle, 1 femelle ou 1 larve), l'identification d'une espèce dispense de réaliser les tests pour la recherche des autres espèces. Le résultat sera alors noté « non détecté » pour les espèces non identifiées.

## 10. Interprétation et formulation du résultat final pour un échantillon

Le résultat final d'identification de *Meloidogyne chitwoodi*, *M. fallax* et *M. enterolobii* résulte de la combinaison des étapes de l'analyse morphobiométrique et des résultats obtenus par les outils moléculaires.

Tableau 11 : synthèse des analyses et résultats finaux

Résultat d'analyse morphobiométrique Vérification genre	Résultat d'analyse biomoléculaire	Résultat final
<i>Meloidogyne</i> <i>sp.</i>	0 néant	<i>M. chitwoodi</i> non détecté <i>M. fallax</i> non détecté <i>M. enterolobii</i> non détecté
	<i>M. chitwoodi</i> } <i>M. fallax</i> } 0 <i>M. enterolobii</i> } <i>M.sp</i> 0	absence d'ADN amplifiable (1)
<i>Meloidogyne</i> <i>sp.</i>	<i>M. chitwoodi</i> } <i>M. fallax</i> } 0 <i>M. enterolobii</i> } <i>M.sp</i> +	<i>M. chitwoodi</i> non détecté <i>M. fallax</i> non détecté <i>M. enterolobii</i> non détecté
	<i>M. chitwoodi</i> } } 0 <i>M. fallax</i> } } 0 <i>M. enterolobii</i> } } 0	<i>M. chitwoodi</i> détecté <i>M. chitwoodi</i> non détecté <i>M. fallax</i> détecté <i>M. fallax</i> non détecté <i>M. enterolobii</i> détecté <i>M. enterolobii</i> non détecté

0 : test négatif ; + : test positif

**(1)** Si aucune amplification n'est obtenue (absence d'ADN amplifiable) les actions suivantes sont menées comme suit :

- de nouveaux individus sont analysés (morphobiométrie et biologie moléculaire). Seuls les résultats des analyses de biologie moléculaire positifs sont pris en compte. Deux résultats négatifs en biologie moléculaire pour une même espèce conduisent à un résultat négatif.
- en cas d'absence de résultats en biologie moléculaire lors de la deuxième analyse ou absence de reliquats, le client en est informé et un rapport d'analyse est édité avec pour résultat « *Meloidogyne* sp. détecté ».

**(2)** Au moins une des cibles est détectée ; plusieurs cibles peuvent être détectées dans un même échantillon.

Le résultat porté sur le rapport d'analyse sera selon le cas :

*Meloidogyne chitwoodi* « détecté » ou « non détecté » et/ou *Meloidogyne fallax* « détecté » ou « non détecté » et/ou *Meloidogyne enterolobii* « détecté » ou « non détecté »  
*Meloidogyne sp.* \* « détecté »

Dans le cas où un nématode du genre *Meloidogyne* autre que *Meloidogyne chitwoodi*, *M. fallax* et *M. enterolobii* est détecté, il pourra être précisé en **commentaire** sur le rapport d'analyse, *Meloidogyne sp.* et/ou le nom de la ou des espèce(s) identifiée(s) par analyse morphobiométrique et/ou biomoléculaire.

## 11. Caractéristiques de performance de la méthode

La synthèse des caractéristiques de performance de la méthode présentée ci-après est extraite de rapports de validation établis par le LNR. Les données de validation de l'analyse ne concerne que les analyses réalisées par PCR.

Les caractéristiques de performance des outils d'identification de *M. chitwoodi*, *M. fallax* et *M. enterolobii* par PCR conventionnelle et/ou PCR temps réel sur individus isolés sont extraits des rapports :

- ✓ « Evaluation des outils de PCR conventionnelle pour l'identification de *Meloidogyne chitwoodi* et *M. fallax* sur individus isolés » (version de septembre 2010).
- ✓ « Évaluation d'un outil de PCR temps réel pour l'identification de *Meloidogyne chitwoodi* et/ou *M. fallax* sur individus isolés » (version Avril 2014).
- ✓ Rapport de caractérisation et de validation d'une méthode d'analyse « Méthode d'identification de *Meloidogyne enterolobii* sur individus isolés » (juin 2023).
- ✓ Données de validation « Développement et adaptation d'outils moléculaires dans le cadre de la détection et de l'identification de *Meloidogyne chitwoodi* et *M. fallax* (2009-2010).

Synthèse des résultats de l'évaluation d'outils d'identification de *M. chitwoodi*, *M. fallax* par PCR

	Wishart <i>et al.</i> (2002) JMV1-JMV2		Clear@Detections Non publiés	
Sensibilité - inclusivité	MC	100%	MC	100%
	MF	100%	MF	100%
Spécificité - exclusivité	MC	97%	MC	100%
	MF	100%	MF	100%
Exactitude	MC	98%	MC	100%
	MF	100%	MF	100%
Seuil de détection	MC	1J2	MC	1J2
	MF	1J2	MF	1J2
		à 1J2		à 1J2
Répétabilité (selon le niveau de contamination)	MC	100%	MC	100%
	MF	100%	MF	100%
Reproductibilité (selon le niveau de contamination)	MC	100%	MC	100%
	MF	100%	MF	100%

MC : *Meloidogyne chitwoodi* ; MF : *Meloidogyne fallax* ;

+ : avantage par rapport aux autres outils, - : inconvénients par rapport aux autres outils,

\* : au seuil de détection

### Synthèse des résultats de l'évaluation d'outils d'identification de *M. enterolobii* par PCR

	Wishart <i>et al.</i> (2002)		Kiewnick <i>et al.</i> (2015)	
	JMV1-JMVtrop		Ment F/Ment R/Ment S	
<b>Sensibilité - inclusivité</b>	ME	100%	ME	100%
<b>Spécificité - exclusivité</b>	ME	100%	ME	100%
<b>Exactitude</b>	ME	100%	ME	100%
<b>Seuil de détection</b>	ME	1J2	ME	1J2
		<i>à 1J2</i>		<i>à 1J2</i>
<b>Répétabilité (selon le niveau de contamination)</b>	ME	100%	ME	100%
<b>Reproductibilité (selon le niveau de contamination)</b>	ME	100%	ME	100%

ME : *Meloidogyne enterolobii* ;

+ : avantage par rapport aux autres outils, - : inconvénients par rapport aux autres outils,

\* : au seuil de détection

Pour la partie identification par outils moléculaires pour l'ensemble des cibles, le seuil de détection est de 1 individu pour atteindre une répétabilité et une reproductibilité de l'essai de 100%.

Attention : en cas de mélange d'individus *M. tropicaux*/*M. enterolobii* : contrairement au test Kiewnick, le test JMVtrop ne permet pas de détecter *M. enterolobii* dans les mélanges dans lesquels il est minoritaire.

## 12. Bibliographie

Castagnone-Sereno, P. (2006). "Genetic variability and adaptive evolution in parthenogenetic root-knot nematodes." Heredity **96**: 282-289.

den Nijs, L., *et al.* (2004). "A Dutch contribution to knowledge on phytosanitary risk and host status of various crops for *Meloidogyne chitwoodi* Golden *et al.*, 1980 and *M. fallax* Karssen, 1996: an overview." Nematology **6**(3): 303-312.

EPPO (2016b). "PM 7/103 (2) *Meloidogyne enterolobii*." EPPO Bulletin **46**(2): 190-201.

EPPO (2016a). "PM 7/41 (3) *Meloidogyne chitwoodi* and *Meloidogyne fallax*." EPPO Bulletin **46**(2): 171-189.

Hunt, D. and Z. Handoo (2009). Taxonomy, identification and principal species, CABI International.

Ibrahim, S. K., *et al.* (1994). "Differentiation of species and populations of *Aphelenchoides* and of *Ditylenchus angustus* using a fragment of ribosomal DNA." Journal of Nematology **26**(4): 412-421.

Jones J.T., *et al.* (2013). "Top 10 plant-parasitic nematodes in molecular plant pathology." Molecular Plant Pathology, **14**(9), 946-961.

Karssen, G. (2002). "The Plant-Parasitic Nematode Genus *Meloidogyne* in Europe." Brill Academic Pub (July 1,2002).

Kiewnick, S., *et al.* (2015). "Development and validation of LNA-based quantitative real-time PCR assays for detection and identification of the root-knot nematode *Meloidogyne enterolobii* in complex DNA backgrounds." Phytopathology, **105**, 1245–1249.

Subbotin, S. A., *et al.* (2021). « Systematics of Root-knot Nematodes (Nematoda: Meloidogynidae).» Leiden, The Netherlands: Brill.

Wishart J. *et al.* (2002) "Ribosomal intergenic spacer: a polymerase chain reaction diagnostic for *Meloidogyne chitwoodi*, *M. fallax* and *M. hapla*." Phytopathology **92**, 884–892.

Zijlstra C. *et al.* (1995). "Differences between ITS regions of isolates of root-knot nematodes *Meloidogyne hapla* and *M. chitwoodi*." Phytopathology, **85**, 1231-1237.