

Méthode d'analyse en santé des végétaux

RÉFÉRENCE : ANSES/LSV/MA073 - Version 01

Consultation

Détection des begomovirus par PCR conventionnelle sur végétal en dehors de la pomme de terre

Laboratoire de la santé des végétaux

Laboratoire national de référence : Mandat « Tous virus sauf virus sur bananier et plantes tropicales, virus de la Sharka (PPV), virus de la pomme de terre, virus sur agrumes et pepino mosaic virus sur semences vraies »

Historique de la méthode

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

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

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

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

Version	Nature des modifications (majeure/mineure)	Date	Principales modifications
v1*	Sans objet	XX/XX/2024	Version initiale

* La version 1 a fait l'objet d'une consultation du XXXXXX au XXXXXXXX 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 Bactériologie, Virologie et détection des OGM

Laboratoire National de Référence « **Mandat Tous virus sauf virus sur bananier et plantes tropicales, virus de la Sharka (PPV), virus de la pomme de terre, virus sur agrumes et pepino mosaic virus sur semences vraies** »

Adresse : 7 rue Jean Dixméras - 49044 Angers CEDEX 01

Contact : LSV.UBVO@anses.fr

Les travaux d'optimisation, d'évaluation et validation ont donné lieu à un rapport de caractérisation et de validation de la méthode en date du 27 septembre 2024.

Sommaire

Avant-propos	3
Introduction	6
Avertissements et précautions de sécurité	7
1. Objet et domaine d'application	8
2. Documents de référence	8
3. Termes, sigles et définitions	8
4. Principe de la méthode	8
5. Réactifs	10
5.1 Eau.....	10
5.2 Extraction d'ADN	10
5.3 Oligonucléotides.....	10
5.4 Kit de PCR conventionnelle	11
5.5 Autres consommables à usage unique.....	11
5.6 Témoins	11
Témoin négatif d'extraction (dénommé ici « E- »).....	12
Témoin positif d'extraction (dénommé ici « E+ »)	12
Témoin négatif de PCR (dénommé ici « A - »)	12
Témoin positif de PCR (dénommé ici « A + »).....	12
6. Appareillage et matériels	13
7. Échantillons	14
7.1 Conditions d'acceptation des échantillons	14
7.2 Conservation des échantillons avant analyse	15
7.3 Conservation des échantillons ou reliquats après analyse.....	15
8. Mode opératoire	16
8.1 Préparation des échantillons pour analyse	16
8.2 Broyage des échantillons.....	16
8.3 Extraction de l'ADN total.....	17
8.4 Amplification de l'ADN par PCR conventionnelle	17
8.4.1 PCR Saison <i>et al.</i> (2015).....	18
8.4.2 PCR Li <i>et al.</i> (2004).....	19

8.5 Electrophorèse	20
9. Résultats	20
9.1 Contrôle de la validité des résultats	20
9.2 Interprétation et expression des résultats	21
10. Caractéristiques de performance de la méthode.....	21
11. Bibliographie.....	23
12. Annexes.....	24
Annexe 1 Tampon d'extraction PBS (Phosphate Buffered Saline).....	24
Annexe 2 Protocole d'extraction d'ADN totaux - kit NucleoMag Plant (Macherey Nagel)	24
Annexe 3 - Programme d'extraction pour l'automate KingFisher™ mL (Thermo Fisher Scientific) avec le kit NucleoMag Plant (Macherey Nagel)	27
Annexe 4 - Programme d'extraction pour l'automate KingFisher™ Flex Magnetic Particle Processors (Thermo Fisher Scientific) avec le kit NucleoMag Plant (Macherey Nagel)	29
Annexe 5 - Programme d'extraction pour l'automate KingFisher™ DuoPrime Magnetic Particle Processors (Thermo Fisher Scientific) avec le kit NucleoMag Plant (Macherey Nagel)	

Introduction

Le genre Begomovirus (Famille Geminiviridae) est le plus grand genre de virus végétaux (424 espèces) (voir <https://ictv.global/taxonomy>). En microscopie électronique, le virion des begomovirus forme une particule de forme jumelée typique («gémignée»). Le génome est un ADN circulaire simple brin monopartite (ADN-A) ou bipartite (ADN-A et ADN-B) qui peut être associé à un ou des ADN satellite (α ou β).

Les begomovirus infectent un large éventail de plantes dicotylédones économiquement importantes (principalement tomate, courgette, melon, concombre) dans le monde entier. Les espèces les plus répandues ou présentant le risque le plus important sont les suivantes : Tomato yellow leaf curl virus (TYLCV), Tomato yellow leaf curl Sardinia virus (TYLCSV), Tomato yellow leaf curl Axarquia virus (TYLCAxV), Tomato yellow leaf curl Malaga virus (TYLCMaV), Tomato leaf curl New Delhi virus (ToLCNDV), Tomato mottle virus (ToMoV), Tomato leaf curl virus (ToLCV).

Dans le cadre du projet Euphresco nommé Begomoval (projet A-212), une étude de performance de tests de détection a été organisée. Celle-ci a permis d'identifier deux tests de PCR conventionnelle conduisant à la détection d'un large éventail de begomovirus. La présente méthode a été rédigée sur la base de données intra et inter-laboratoires et précise les modalités de mise en œuvre de ces tests.

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 exécutées par du personnel ayant reçu une formation appropriée.

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

L'exigence de confinement pour la détention / manipulation de formes viables de ces virus doit être en accord avec la réglementation en vigueur dans la région où se situe le laboratoire d'analyse.

Par ailleurs, l'utilisateur de la présente méthode doit mettre en œuvre toutes les mesures nécessaires pour garantir la non-dissémination de l'organisme nuisible dans l'environnement.

Tout fragment de matériel végétal (quel que soit son statut) doit être détruit par autoclavage ou autre moyen inactivant les virus, ainsi que tous les consommables avec lesquels ils ont été en contact.

Tout matériel utilisé lors du processus doit être désinfecté.

1. Objet et domaine d'application

La présente méthode a pour objet la détection des begomovirus sur échantillons symptomatiques ou non, sur toutes espèces hôtes en dehors de la pomme de terre. La présence de begomovirus est mise en évidence par l'utilisation de deux PCR conventionnelles simultanées (Saison *et al.*, 2015 et Li *et al.*, 2014). Cette méthode s'applique sur les feuilles et les fruits des plantes hôtes.

Cette méthode est qualitative, elle permet de détecter la présence des begomovirus dans la limite du seuil de détection mais ne permet pas de quantifier la cible dans l'échantillon analysé. Elle ne permet pas d'identifier le begomovirus, il est pour cela nécessaire de faire un séquençage sur le ou les produits PCR obtenus.

2. 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.

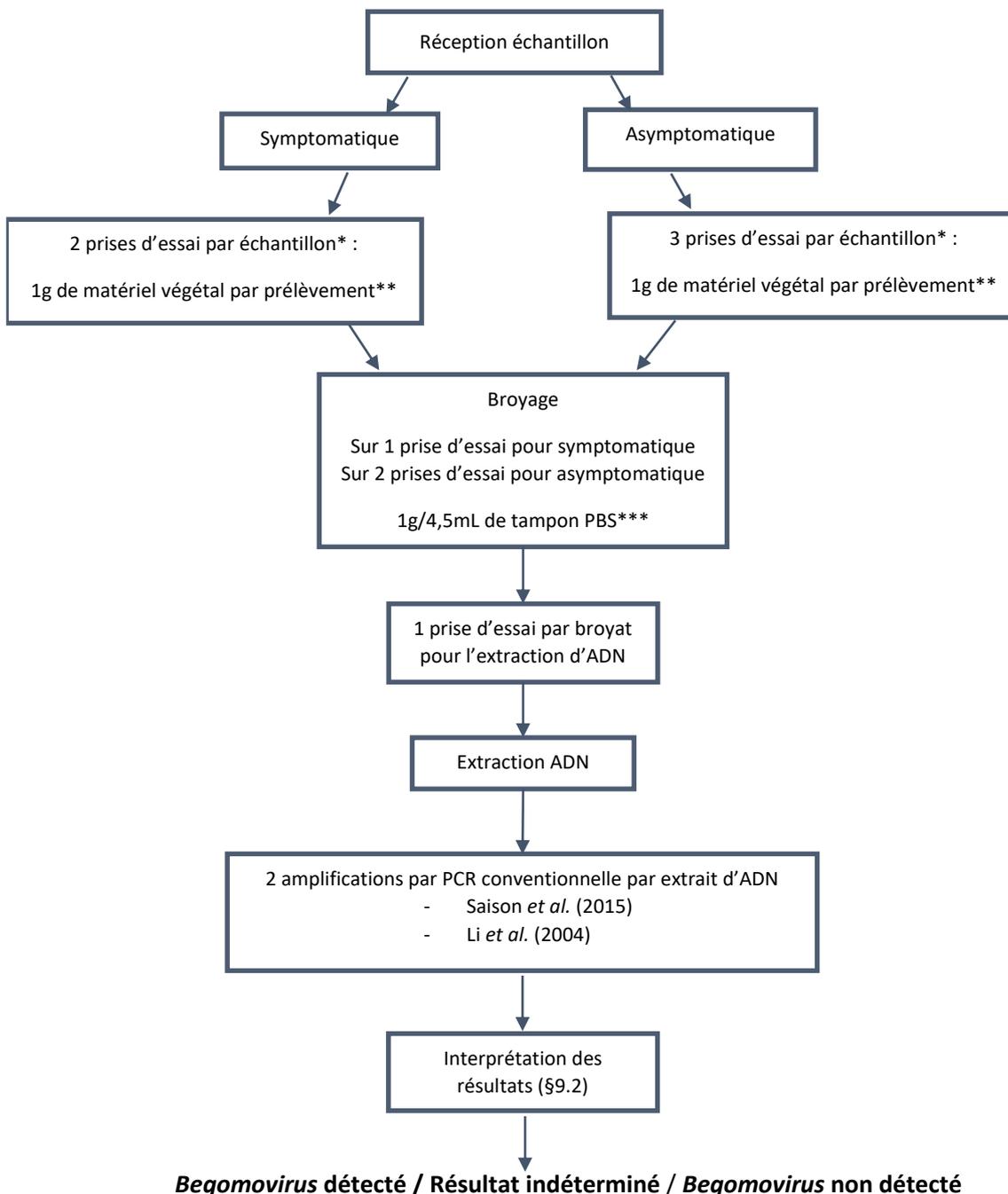
3. Termes, sigles et définitions

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

4. Principe de la méthode

La méthode est une méthode de biologie moléculaire. L'extraction de l'ADN total est réalisée sur le principe de billes magnétiques et robotisée en 15 ou 96 places. La détection des begomovirus se fait ensuite par 2 PCR conventionnelles en simultanée avec l'amplification d'une zone du génome codant pour la protéine de capsid (CP) pour la PCR Saison *et al.* (2015) et des zones conservées des gènes codant pour les protéines AC1 et AC2 pour la PCR Li *et al.* (2004).

Le principe de la méthode pour la détection des begomovirus est présenté dans le schéma ci-dessous :



* Une prise d'essai est conservée pour un usage ultérieur

** Les prélèvements indiqués sont des recommandations

*** En cas de quantité inférieure, respecter le rapport quantité/volume

5. Réactifs

Avertissement : Des appellations commerciales ou fournisseurs peuvent être mentionnés 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, par le nettoyage, par la stérilisation ou tout autre traitement approprié) à l'absence dans l'eau, produits et consommables utilisés, de contaminant (ADN), 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 de conservation qu'il jugera optimales.

5.1 Eau

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

5.2 Extraction d'ADN

L'ADN total des prises d'essai analysées est extrait et purifié à l'aide de kits d'extraction d'ADN de plante disponible dans le commerce.

Le kit d'extraction validé par le LNR pour cette méthode est le kit Nucleomag plant Macherey Nagel© (Macherey-Nagel© Référence 744400.4).

Toutefois, l'extraction d'ADN pourra aussi être réalisée avec toute autre méthode ayant montré des performances équivalentes à la méthode décrite dans le présent document.

5.3 Oligonucléotides

Les séquences (5'-3') des amorces de l'ADN viral des begomovirus (Saison et al., 2015) sont présentées dans le Tableau 1 :

Tableau 1 : amorces de la méthode Saison et al. (2015)

Nom amorces	Séquences	Taille amplicon
Beg CP F	5'-GCCCATGTAYMGRAARCC-3'	860 pb pour WmCSV* ou
Beg 580 R	5'-GGRTTAGARGCATGMGTACA-3'	580 pb pour les autres begomovirus

Y: T/C; M: A/C; R: A/G * : Watermelon chlorotic stunt virus

Les séquences (5'-3') des amorces de l'ADN viral des begomovirus (Li et al., 2004) sont présentées dans le Tableau 2 :

Tableau 2 : amorces de la méthode Li et al. (2004)

Nom amorces	Séquences	Taille amplicon
SPG1	5'-CCCCKGTGCGWRAATCCAT-3'	912pb
SPG2	5'-ATCCVAAYWTYCAGGGAGCTAA-3'	

W: A/U; K: G/U; V: A/G/C; Y: C/U; R: A/G

5.4 Kit de PCR conventionnelle

La méthode a été validée avec le kit Platinum Taq[®]DNA polymerase (Invitrogen).

Le kit d'amplification de PCR utilisé peut-être modifié, sous réserve d'obtenir des performances équivalentes.

5.5 Autres consommables à usage unique

- Coupelles de pesée ou autre système de pesée adapté ;
- Sacs de broyage avec gaze de filtration à mailles en nylon à usage unique (type Bioreba) ;
- Cônes à filtre pour pipettes de volumes adaptés (plage 0,5 µL à 5 mL) ;
- Microtubes RNase DNase free de 1,5 mL;
- Microtubes ou plaques PCR (qualité biologie moléculaire DNase free) de volume adapté au thermocycleur conventionnel utilisé, à paroi fine, en barrette de 8 puits ou en plaque de 96 puits ;
- Consommables nécessaires à l'électrophorèse ;
- Consommables spécifiques à l'utilisation des automates.

Exemples de consommables spécifiques à l'utilisation des automates :

- Barrettes de tubes KingFisher™ mL tube strip 5 et peignes KingFisher™ mL Tip comb 5 (Thermo Fisher Scientific) pour le KingFisher™ mL
- Microplaques de 96 puits « KingFisher 96 plate », microplaque « KingFisher 96 Deepwell plate » et « tip comb » pour plaque 96 puits pour le KingFisher™ Flex

5.6 Témoins

La technique de détection de régions cibles d'ADN d'un organisme par la technique de PCR conventionnelle requiert l'utilisation d'une série de témoins permettant de valider la bonne qualité de la manipulation.

Les témoins décrits ci-dessous sont traités à l'identique des autres échantillons. Ces témoins ainsi que des témoins supplémentaires que le laboratoire peut ajouter si nécessaire sont définis par la MOA022.

Les contrôles doivent donner les résultats escomptés avant de valider les résultats de l'analyse.

Les témoins à produire permettant de garantir la fiabilité des résultats au cours de l'analyse sont a minima les suivants :

Témoin négatif d'extraction (dénommé ici « E- »)

Il sera préparé pour chaque série d'extractions. Il est composé d'un échantillon ne contenant pas d'organisme cible. Si possible, il sera de la même espèce végétale que les échantillons testés ; à défaut, ce sera du tampon de broyage (PBS). Ce contrôle subira toutes les phases de l'analyse à partir de la phase d'extraction. Il permet de vérifier l'absence de contamination croisée par la cible begomovirus entre les échantillons ou de contamination externe lors de la phase d'extraction de l'ADN.

Témoin positif d'extraction (dénommé ici « E+ »)

Il sera préparé pour chaque série d'extractions. Il est composé d'un échantillon défini comme contenant un organisme cible (begomovirus). Il subira toutes les phases de l'analyse à partir de la phase d'extraction. Il permet de contrôler la qualité et le bon fonctionnement de l'extraction de l'ADN.

Témoin négatif de PCR (dénommé ici « A - »)

Systématiquement introduit lors de chaque réaction de PCR conventionnelle, la réaction de PCR est réalisée avec de l'eau ultra pure et/ou mélange réactionnel exempt d'ADN et d'inhibiteur de PCR (1 puits au minimum). Ce témoin permet de vérifier la qualité de la manipulation et l'absence de contamination lors de cette étape.

Témoin positif de PCR (dénommé ici « A + »)

Systématiquement introduit lors de chaque réaction de PCR conventionnelle, la réaction de PCR contenant les séquences d'ADN cibles (begomovirus) en quantité ou en nombre de copies détectable. Les témoins positifs d'extraction des manipulations précédentes peuvent faire office de A+ (1 puits au minimum). Ce témoin permet de vérifier la qualité de l'amplification ainsi que la qualité de la manipulation et le bon fonctionnement du matériel.

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 valeurs de prescription et les erreurs maximales tolérées (EMT) à prendre en considération sont données dans le tableau 3 ci-après (dans le cas contraire, des spécifications sont précisées dans le texte de la méthode).

Tableau 3 : Erreurs maximales tolérées

Grandeur	EMT
Volume	EMT définies par la MOA022 version en vigueur ou EMT normes ISO 8655
Masse	EMT = $\pm 10\%$
Température	Thermobloc, bain à sec, incubateur : EMT = $\pm 5^{\circ}\text{C}$ Réfrigérateur : 5°C et EMT = $\pm 4^{\circ}\text{C}$ Congélateur : $\leq -18^{\circ}\text{C}$ Thermocycleur* : EMT justesse = $\pm 1^{\circ}\text{C}$; EMT homogénéité = $\pm 2^{\circ}\text{C}$

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

En plus de l'appareillage courant, le matériel suivant est jugé nécessaire pour certaines phases de l'analyse :

Prise d'essai

- Balance de portée et d'exactitude adaptées à la pesée des échantillons (ex : balance de classe II) ;
- Tout outil éventuellement nécessaire pour prélever l'échantillon de laboratoire et effectuer une fragmentation sommaire des tissus végétaux : sécateur; ciseaux, emporte-pièce... ;
- Broyeur de tissus végétaux et petit matériel adapté pour dilacérer les tissus végétaux, par exemple : broyeur à billes avec sachets de broyage, broyeur à rouleaux avec tubes (type hémolyse), presse à genouillère, ou ensemble équivalent permettant le broyage en présence de tampon ;

Extraction d'ADN

- Hotte chimique ou sorbonne ;
- Verrerie pour les préparations et le stockage (flacons bouchonnés et éprouvettes) pouvant être autoclavée ;
- Centrifugeuse permettant d'atteindre une force centrifuge relative d'environ 1000 g à 18000 g et rotor adapté pouvant recevoir des tubes plastiques de 1,5mL ;
- Thermobloc ou bain-à-sec ou incubateur (température 56°C) (pour la lyse cellulaire) ;
- Agitateur de tubes de type Vortex
- Pipettes automatiques (plage de mesure de 0,5 µL à 5 mL)
- Automate de type KingFisher™ mL (Thermo Fisher Scientific), KingFisher™ Flex Magnetic Particle Processors (Thermo Fisher Scientific), ou KingFisher™ DuoPrime Magnetic Particle Processors (Thermo Fisher Scientific), compatible avec kit Nucleomag plant Macherey Nagel©

Équipement pour l'amplification

- Pipettes automatiques (plage de mesure de 0,5 µL à 1 mL) ;
- Appareil de PCR conventionnelle
- Cuve électrophorèse
- Appareil UV

Stockage des échantillons et des ADN

- Congélateur (température ≤ -18°C) ;
- Réfrigérateur (température = 5°C)

7. Échantillons

7.1 Conditions d'acceptation des échantillons

Pour que les échantillons soient acceptés sans réserve, les éléments suivants doivent être respectés :

- Les échantillons de feuilles ou fruits reçus pour analyse doivent être dans un bon état de conservation, c'est-à-dire, ni desséchés, ni nécrosés ni en cours de décomposition.
- 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. Pour les échantillons lyophilisés ou déshydratés, ils doivent être complètement déshydratés, c'est-à-dire sans développement de moisissures.
- La taille de l'échantillon est suffisante pour réaliser les prises d'essai nécessaires.
- Le transport peut être réalisé à température ambiante.

Dans le cas contraire, le laboratoire contacte le client dans les plus brefs délais en précisant les raisons du refus d'analyse.

7.2 Conservation des échantillons avant analyse

Le délai entre la réception de l'échantillon et le début effectif de l'analyse (prise d'essai) doit être inférieur à 5 jours calendaires pour des échantillons prélevés dans de bonnes conditions.

En attente de traitement, l'échantillon devra être conservé à 5°C.

7.3 Conservation des échantillons ou reliquats après analyse

Cas d'un échantillon négatif : 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 quinzième jour ouvrable suivant l'envoi au demandeur d'un rapport d'analyse pour éventuellement permettre la demande d'une analyse contradictoire par le client.

Cas d'un échantillon positif : l'ensemble des reliquats pertinents (équivalent de 1 à 2 prises d'essai, extrait d'ADN) doit être conservé pendant une durée minimale de 12 mois, sauf pour les parties éventuellement transmises au laboratoire de référence, à qui est alors transférée la charge de conservation des reliquats.

Les conditions de conservation des différents types de reliquats d'échantillon à conserver en vue d'éventuelles analyses complémentaires sont présentées dans le tableau 4 ci-après :

Tableau 4 : Conditions de conservation des échantillons

Etapas	Type de reliquat	Conservation		Modalités d'envoi à un autre laboratoire le cas échéant
		Durée	Conditions	
Prélèvement	Feuilles, Fruits,	Résultat négatif : 15 jours après envoi du rapport	+5°C	Sachets individuels fermés et clairement identifiés Température ambiante Transporteur rapide
		Résultat autre que négatif: 12 mois	+5°C jusqu'à obtention du résultat (ou jusqu'à envoi au LNR) puis ≤-18°C	
Broyage	Broyat végétal	Résultat négatif : 15 jours après envoi du rapport	≤-18°C	Sachets / Tubes / pots fermés hermétiquement et clairement identifiés Bloc froid Transporteur rapide
		Résultat autre que négatif: 12 mois		
Extraction d'ADN	Extraits d'ADN	Résultat négatif : 15 jours après envoi du rapport	≤-18°C	Tubes hermétiques clairement identifiés Bloc froid Transporteur rapide
		Résultat autre que négatif: 12 mois		

8. Mode opératoire

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

8.1 Préparation des échantillons pour analyse

Les échantillons sont à manipuler avec des gants à remplacer entre chaque échantillon.

Entre chaque échantillon, les coupelles de pesée sont changées et la paillasse est nettoyée avec de l'hypochlorite de sodium (2,6 % de chlore actif) ou un produit d'efficacité équivalente (Virkon 1%...) afin d'éviter les contaminations croisées (destruction des traces d'ADN).

Chaque prélèvement est déposé dans un sachet de broyage avec gaze pour la filtration des particules grossières (type Bioreba). Chaque sachet sera préalablement identifié pour assurer la traçabilité.

Pour chaque échantillon de feuille ou de fruit, 2 ou 3 prises d'essai de 1 g sont réalisées :

- 2 prises d'essai dans le cas d'échantillon symptomatique
- 3 prises d'essai dans le cas d'échantillon asymptomatique.

Dans tous les cas, 1 prise d'essai sera conservée selon les conditions décrites dans le paragraphe 7.2.

Pour les prises d'essai des échantillons de feuilles ou fruits, une tolérance de 5% est appliquée lors de la pesée ($0,95 \text{ g} \leq \text{masse de la prise d'essai} < 1,05 \text{ g}$).

Remarque : Si le matériel est déshydraté ou lyophilisé, la pesée correspondante à un gramme de matériel frais est de 0,04 g.

8.2 Broyage des échantillons

Ajouter à la prise d'essai 4,5 mL de tampon PBS (Annexe 1).

Broyer finement la prise d'essai à l'aide d'un broyeur à billes ou de toute autre méthode de broyage permettant d'obtenir des résultats comparables (cf. Photo 1).

Les broyats obtenus doivent être conservés au réfrigérateur et utilisés rapidement.

Après extraction, les broyats doivent être conservés au congélateur pour des besoins ultérieurs.



Photo 1 : Broyage d'un prélèvement de feuille de tomate

8.3 Extraction de l'ADN total

L'ADN est extrait selon le mode opératoire du kit NucleoMag Plant® kit Macherey Nagel©. Ce protocole d'extraction est disponible en Annexe 2 et les programmes d'extraction selon les automates utilisés sont disponibles en Annexes 3, 4 et 5.

Pour chaque échantillon de feuille ou de fruit :

- 1 seule prise d'essai est extraite pour les échantillons symptomatiques
- 2 prises d'essai sont extraites pour les échantillons asymptomatiques

Pour chaque série d'extraction, insérer les témoins tel que décrit au point 5.6.

8.4 Amplification de l'ADN par PCR conventionnelle

Pour chaque extrait d'ADN, deux amplifications doivent être réalisées pour chacune des deux PCR suivantes Saison *et al.* (2015) et Li *et al.* (2004).

Pour chaque série d'amplification, insérer les témoins PCR d'amplification tel que décrit au point 5.6.

Les protocoles proposés correspondent à ceux validés par le LNR avec le Kit Platinum Taq DNA Polymerase (Invitrogen™).

La composition de chaque mélange réactionnel pour une réaction est présentée dans les La composition du mélange réactionnel et les paramètres d'amplification de la PCR Saison *et al.* (2015) sont respectivement décrits dans les tableaux 5 et 6.

Tableau :

8.4.1 PCR Saison et al. (2015)

La composition du mélange réactionnel et les paramètres d'amplification de la PCR Saison et al. (2015) sont respectivement décrits dans les tableaux 5 et 6.

Tableau 5 : Composition du mélange réactionnel pour la PCR Saison et al. (2015)

Réactifs	Concentration finale	Quantité finale
Eau ultra pure		qsp 23 µL
Tampon de reaction*	1 X	2,50 µL
MgCl ₂ *	1,60 mM	0,80 µL
dNTPs (mix)	0,10 mM	0,50 µL
Amorce Beg CP F	0,30 µM	0,75 µL
Amorce Beg 580 R	0,30 µM	0,75 µL
Enzyme Taq DNA*	0,04 U/µL	0,20 µL
Volume réactionnel		23 µL
Extrait d'ADN		2 µL
Volume final		25 µL

* Kit Platinum Taq DNA Polymerase (Invitrogen™)

Tableau 6 : Paramètres d'amplification pour la PCR Saison et al. (2015)

Etape	Température	Durée programmée	Nombre de cycles
Dénaturation	94°C	3 min	35
Dénaturation	94°C	30 s	
Hybridation	58°C	35 s	
Elongation	72°C	30 s	
Elongation finale	72°C	7 min	
Conservation	12°C	infini	

Le produit d'amplification attendu mesure 860 pb pour le WmCSV et 580 pb pour tous les autres begomovirus.

8.4.2 PCR Li et al. (2004)

La composition du mélange réactionnel et les paramètres d'amplification de la PCR Li et al. (2004) sont respectivement décrits dans les tableaux 7 et 8.

Tableau 7 : Composition du mélange réactionnel pour la PCR Li et al. (2004)

Réactifs	Concentration finale	Quantité finale
Eau ultra pure		qsp 29 µL
Tampon de reaction*	1 X	3,00 µL
MgCl ₂ *	2 mM	1,20 µL
dNTPs (mix)	0,10 mM	0,60 µL
Amorce SPG1	0,20 µM	0,60 µL
Amorce SPG2	0,20 µM	0,60 µL
Enzyme Taq DNA*	0,04 U/µL	0,24 µL
Volume réactionnel		29 µL
Extrait d'ADN		1 µL
Volume final		30 µL

* Kit Platinum Taq DNA Polymerase (Invitrogen™)

Tableau 8 : Paramètres d'amplification pour la PCR Li et al. (2004)

Etape	Température	Durée programmée	Nombre de cycles
Dénaturation	94°C	2 min	
Dénaturation	94°C	40 s	11
Hybridation	Ramping : 61°C + 1°C/cycle jusqu'à 71°C	40 s	
Elongation	72°C	1 min 30	
Dénaturation	94°C	40 s	24
Hybridation	60°C	40 s	
Elongation	72°C	1 min 30	
Elongation finale	72°C	10 min	
Conservation	12°C	infini	

Le produit d'amplification attendu mesure 912 pb.

8.5 Electrophorèse

Pour chaque produit d'amplification, déposer environ 10 µL mélangé au tampon de charge sur un gel d'agarose à environ 1,5% (Poids/Poids). Un marqueur de taille moléculaire, dont l'intervalle encadre la taille des fragments attendus, doit être déposé sur chaque ligne de dépôt afin de définir la taille des fragments obtenus.

Après révélation, il est conseillé d'effectuer une prise de vue du gel exposé aux UV et d'utiliser cette prise de vue (impression ou fichier informatique) pour analyser les résultats.

9. Résultats

9.1 Contrôle de la validité des résultats

La validation de l'analyse s'effectue en observant les bandes obtenues sur le gel d'agarose. Une série d'analyses (même réaction de PCR) est considérée validée si et seulement si l'ensemble des conditions suivantes est réuni :

Tableau 9 : Conditions de validation des témoins

Type de contrôle		Résultats attendus	Interprétation
E-	Témoin négatif d'extraction	NEGATIF	Il n'y a pas eu de contamination de la série d'échantillons lors de la phase de broyage / extraction d'ADN, pas de faux-positifs générés à cette étape.
A-	Témoin négatif d'amplification	NEGATIF	Il n'y a pas eu de contamination de la série d'échantillons lors de la phase de préparation du mélange réactionnel / addition des extraits d'ADN à tester, pas de faux-positifs générés à cette étape.
E+	Témoin positif d'extraction	POSITIF	L'ensemble des conditions mises en œuvre pendant l'analyse ou l'extraction ont permis de produire des solutions d'acides nucléiques amplifiables à partir des échantillons.
A+	Témoin positif d'amplification	POSITIF	L'ensemble des conditions mises en œuvre pour l'amplification par PCR a permis l'amplification des cibles du test.

Dans le cas où une ou plusieurs conditions ne seraient pas respectées, la série d'analyse n'est pas validée et selon le type d'anomalie observée, tout ou partie de l'analyse doit être réitérée.

9.2 Interprétation et expression des résultats

Si la série d'analyse est validée par le contrôle des témoins, les résultats peuvent être considérés comme interprétables des prises d'essai testés au cours de la même réaction de PCR.

Le statut d'un échantillon est déterminé sur la base des critères suivants :

- Pour une réaction d'amplification observée sur gel d'agarose, lorsqu'un produit d'amplifié est observé à la taille attendue (580 ou 860 pb (Saison *et al.*,2015) / 912 pb (Li *et al.*,2004)), le résultat est considéré comme positif. Dans les autres cas, il est considéré négatif.
- Le tableau ci-dessous présente les règles de décision pour l'interprétation des résultats en fonction du résultat de chaque PCR :

Tableau 10 : Interprétation des résultats pour les deux PCR

PCR	Li <i>et al.</i> (2004)			
	Résultats des 2 puits	+/+	+/-	-/-
Saison <i>et al.</i> (2015)	+/+	+	+	+
	+/-	+	indéterminé	indéterminé
	-/-	+	indéterminé	-

Remarque : en cas de résultat indéterminé, l'extraction et/ou l'amplification d'ADN pourra être renouvelée sur décision du laboratoire.

Expression des résultats sur le rapport d'analyse :

Le résultat final du test est exprimé sous forme qualitative : « négatif/positif/indéterminé » ou « _détecté/non détecté/indéterminé » ou mention équivalente.

10. Caractéristiques de performance de la méthode

La synthèse des caractéristiques de performance de la méthode présentée dans le tableau ci-après est extraite des documents suivants :

- Rapport de validation associé à cette méthode établi par le LNR le 27/09/2024
- Final report : EURL-Virology_PT-2021-01-Begomo : Proficiency test for the detection and identification of begomoviruses capable of infecting tomatoes and plants of the family cucurbitaceae
- Assessment of a generic method for the detection of begomoviruses (BegomoVal) Janvier 2022 <https://zenodo.org/record/5909640#.YlfiO-hByUm>

Tableau 11 : Synthèse des caractéristiques de performance de la MA073 version 1

Caractéristiques de performances		Valeurs obtenues à l'issue de la caractérisation		Paramètres	Principales informations relatives aux modalités de réalisation de la caractérisation
		Saison et al. (2015)	Li et al. (2004)		
Inclusivité/ Sensibilité relative	Intra-laboratoire	98,9% 1 isolat de TYLCV non détecté	100%	Capacité de la méthode à rendre un résultat positif lorsque la cible est présente.	46 extraits ADN contaminés par des begomovirus obtenus à partir des campagne 2022 et 2023 Chaque extrait a été testé 2 fois.
	Inter-laboratoire	99%	70% 3 isolats (ToLCMLV, ACMV et WmCSV) non détectés		16 extraits ADN contaminés par des begomovirus Chaque extrait a été testé 2 fois.
Exclusivité/ Spécificité relative	Intra-laboratoire	100%	100%	Capacité de la méthode à rendre un résultat négatif lorsque la cible n'est pas présente	358 extraits ADN sains ou non contaminés par des begomovirus obtenus à partir des campagne 2022 et 2023. Chaque extrait a été testé 2 fois
	Inter-laboratoire	93%	97%		5 extraits ADN sains ou non contaminés par des begomovirus. Chaque extrait a été testé 2 fois.
Seuil de détection/ Sensibilité analytique	Intra-laboratoire	10 ⁻⁵	10 ⁻³	Niveau de dilution le plus important pour lequel l'ensemble des répétitions est positif.	Gamme de dilution à 6 niveaux d'extrait ADN positif d'un begomovirus dans de l'extrait ADN de melon sain. Chaque niveau a été testé 6 fois.
Répétabilité/ Fidélité	Inter-laboratoire	100%	100%	Etroitesse d'accord entre des résultats successifs et indépendants obtenus avec un matériel d'essai identique dans des conditions identiques.	Calculé sur la base de 2 amplifications par échantillon pour 4 laboratoires au cours de l'essai inter-laboratoires

Reproductibilité	Inter-laboratoire	91%	82%	Etroitesse d'accord entre des résultats successifs et indépendants obtenus avec un matériel d'essai identique par des opérateurs de différents laboratoires utilisant un équipement différent.	Calculé sur la base des résultats d'amplification pour chaque PCR par 6 laboratoires différents au cours de l'essai inter-laboratoires
------------------	-------------------	-----	-----	--	--

11. Bibliographie

- Li, Ruhui, Sarbagh Salih, and Suzanne Hurtt. 2004. "Detection of geminiviruses in sweet potato by polymerase chain reaction." *Plant disease* 88 (12):1347-1351.
- Saison, A. and Gentit P. 2015. "Development of a polyvalent detection method for Begomoviruses presenting a threat to the European tomato industry." *Testa - EPPO Conference on diagnostics for plant pests, Angers, 30/11 au 04/12/2015.*
- OEPP Bulletin OEPP/EPPO Bulletin, 2022; 52:643-664 Diagnostic PM7/152 (1) Begomoviruses Juillet 2022

12. Annexes

Annexe 1 Tampon d'extraction PBS (Phosphate Buffered Saline)

Nom produit	Quantité	Unité
chlorure de sodium (NaCl)	8,0	g
hydrogénophosphate de disodium ($\text{Na}_2\text{HPO}_4, 12\text{ H}_2\text{O}$)	2,7	g
dihydrogénophosphate de sodium ($\text{NaH}_2\text{PO}_4, 2\text{ H}_2\text{O}$)	0,40	g
eau déminéralisée	1000	mL
pH	7,2	

Commentaires	<p>Il est possible d'autoclaver à environ 121°C pendant 20 min. Dans ce cas, les flacons stérilisés et bouchés peuvent alors être conservés pendant 6 mois. Les flacons stérilisés doivent être utilisés dans les 30 jours suivant leur ouverture.</p> <p>Les flacons non autoclavés seront à utiliser dans un délai de 30 jours.</p>
--------------	---

Annexe 2 Protocole d'extraction d'ADN totaux - kit NucleoMag Plant (Macherey Nagel)

Broyage

- Peser 1 g de matériel frais ou congelé non broyé ou 0,04 g de matériel lyophilisé déjà broyé en sachet Bioreba dans 4,5 mL de tampon PBS
- Broyer avant de transférer 500µL du broyat en tube Eppendorf de 1,5 mL

Séparation de phase

Pour l'automate 15 places

- 1- Sous sorbonne, ajouter 500 µL de tampon MC1 dans chaque microtube de 1,5 mL correspondant + 10 µL de RNase A
- 2- Vortexer vigoureusement 30 secondes
- 3- Placer 30 min à 56°C
- 4- Centrifuger 20 min à 6000 g minimum

- 5- Sous sorbonne, reprendre 400 μ L de surnageant (en évitant de pipeter des débris) et le déposer dans le puits A de la barrette selon le plan de dépôt prévu, mettre le plateau préparé (voir partie « Capture-Lavages-Elution » ci-dessous) dans l'automate KingFisher ou Qiagen
- 6- Allumer l'automate d'extraction et démarrer le programme « NucleoMag Plant » pour une durée de 40 min environ (programmation sur le logiciel Biosprint).

Pour l'automate 96 places

- 1- Faire les mêmes étapes 1 à 4 de la partie « Automate 15 places ».
- 2- Sous sorbonne, reprendre 400 μ L de surnageant (en évitant de pipeter des débris) et les déposer dans chaque puits de la plaque pour chaque échantillon selon le plan de dépôt prévu, mettre la plaque préparée (voir partie « Capture-Lavages-Elution » ci-dessous) dans l'automate KingFisher Flex 96 puits
- 3- Allumer l'automate d'extraction et démarrer le programme « NucleoMag Plant » pour une durée de 45 min environ (programmation sur le logiciel Biosprint) en ayant pris soin au préalable d'avoir placé toutes les plaques nécessaires au bon déroulement de l'extraction (voir partie « Capture-Lavages-Elution » ci-dessous).

Capture-Lavages-Elution

Pour l'automate 15 places

- Disposer les barrettes sur le plateau de l'automate
- Disposer les peignes sous les aimants de l'automate, en veillant au sens et à l'alignement avec les barrettes (en regardant par la trappe du dessus)
- Sous sorbonne, déposer les tampons dans les puits des barrettes, selon le schéma suivant:

Côté gauche= languette	A(2) + 400 μ L Lysat		B	C	D	E
Tampons	Binding MC2	Billes magnétiques MN	Lavage MC3	Lavage MC4	Lavage EtOH 80% + 5 min évaporation (remplace l'étape de rinçage MC5)	Elution MC6 (55°C si possible)
Volumes (μ L)	400	30	600	600	600	100

Pour l'automate 96 places :

- Sous sorbonne, déposer les tampons dans les puits des plaques, selon le schéma suivant :

Plaque	Binding + 400 μ L Lysat		Wash 1	Wash 2	Wash 3	Wash 4	Elution
Tampons	Binding MC2	Billes magnétiques MN	Lavage MC3	Lavage MC4	Lavage EtOH 80%	Lavage MC5	Elution MC6 (55°C si possible)
Volumes (μ L)/puits	400	30	600	600	600	600	100

- Disposer le tip-comb et les plaques dans l'automate comme indiqué dans le programme

Récupération de l'ADN

Pour l'automate 15 places

- 1- Sortir le plateau, jeter les peignes et transférer l'ADN dans un nouveau tube (ou une plaque) en veillant à ne pas prélever les billes magnétiques restantes. Pour cela, disposer le tube E de la barrette sur un aimant type DynaMag™- Invitrogen et attendre au moins 5 secondes avant de prélever le surnageant.
- 2- Nettoyer l'intérieur de l'automate à l'amphospray puis à l'alcool

Pour l'automate 96 places

- 1- Sortir la plaque et la filmer (film collant ou scellé), jeter les autres plaques et le tip-comb.
- 2- Stocker la plaque au réfrigérateur pour une utilisation immédiate ou au congélateur pour une utilisation ultérieure

Annexe 3 - Programme d'extraction pour l'automate KingFisher™ mL (Thermo Fisher Scientific) avec le kit NucleoMag Plant (Macherey Nagel)

Reagent info

A (Binding)			
Name	Well volume [µl]	Total reagent volume [µl]	Type
Binding MC2	400	-	Reagent
Billes magnétiques	30	-	Reagent
Lysat	400	-	Reagent
B (Wash MC3)			
Name	Well volume [µl]	Total reagent volume [µl]	Type
MC3	600	-	Reagent
C (Wash MC4)			
Name	Well volume [µl]	Total reagent volume [µl]	Type
MC4	600	-	Reagent
D (Wash EtOH 80)			
Name	Well volume [µl]	Total reagent volume [µl]	Type
Ethanol 80%	600	-	Reagent
E (Elution)			
Name	Well volume [µl]	Total reagent volume [µl]	Type
MC6	100	-	Reagent

Steps data

 Tip1	Tip comb	
	Binding	(A) - Binding
	Beginning of step	Precollect Release time, speed
	Mixing / pause:	00:00:30, Bottom mix Mixing time, speed
	End of step	00:05:00, Half mix Pause for manual handling
		No
		Postmix
		No
	Wash MC3	(B) - Wash MC3
	Beginning of step	Precollect Release time, speed
	Mixing / pause:	00:00:20, Bottom mix Mixing time, speed
	End of step	00:05:00, Half mix Pause for manual handling
		No
		Postmix
		No
	Wash MC4	(C) - Wash MC4
	Beginning of step	Precollect Release time, speed
	Mixing / pause:	00:00:10, Bottom mix Mixing time, speed
	End of step	00:05:00, Half mix Pause for manual handling
		No
		Postmix
		No
	Wash EtOH 80	(D) - Wash EtOH 80
	Beginning of step	Precollect Release time, speed
	Mixing / pause:	00:00:10, Bottom mix Mixing time, speed
	End of step	00:05:00, Half mix Pause for manual handling
		No
		Postmix
		No
	Dry1	(D) - Wash EtOH 80
		Dry time
		00:05:00 Tip position
	Elution	(E) - Elution
	Beginning of step	Precollect Release time, speed
	Mixing / pause:	00:00:30, Bottom mix Mixing time, speed
	End of step	00:07:00, Bottom mix Pause for manual handling
		No
		Postmix
		No
	Collect count	
	5	
	Collect time [s]	
	30	

Annexe 4 - Programme d'extraction pour l'automate KingFisher™ Flex Magnetic Particle Processors (Thermo Fisher Scientific) avec le kit NucleoMag Plant (Macherey Nagel)

Reagent info

Binding		96 DW plate	
Name	Well volume [µl]	Total reagent volume [µl]	Type
Binding MC2	400	-	Reagent
Billes magnétiques	30	-	Reagent
Lysat	400	-	Reagent
1st Wash MC3		96 DW plate	
Name	Well volume [µl]	Total reagent volume [µl]	Type
MC3	600	-	Reagent
2nd Wash MC4		96 DW plate	
Name	Well volume [µl]	Total reagent volume [µl]	Type
MC4	600	-	Reagent
3rd Wash EtOH 80		96 DW plate	
Name	Well volume [µl]	Total reagent volume [µl]	Type
Ethanol 80%	600	-	Reagent
4th Wash MC5		96 DW plate	
Name	Well volume [µl]	Total reagent volume [µl]	Type
MC5	600	-	Reagent
Elution		96 standard plate	
Name	Well volume [µl]	Total reagent volume [µl]	Type
Elution MC6	100	-	Reagent
Tip-plate		96 standard plate	
Name	Well volume [µl]	Total reagent volume [µl]	Type
-	-	-	-

Steps data

	Tip1	96 DW tip comb	
	Pick-Up	Tip-plate	
	Binding	Binding	
	Beginning of step	Precollect	No
		Release time, speed	00:00:30, Bottom mix
	Mixing / heating:	Mixing time, speed	00:05:00, Half mix
		Heating during mixing	No
	End of step	Postmix	No
		Collect count	5
		Collect time [s]	30
	1st Wash MC3	1st Wash MC3	
	Beginning of step	Precollect	No
		Release time, speed	00:00:20, Bottom mix
	Mixing / heating:	Mixing time, speed	00:05:00, Half mix
		Heating during mixing	No
	End of step	Postmix	No
		Collect count	5
		Collect time [s]	30
	2nd Wash MC4	2nd Wash MC4	
	Beginning of step	Precollect	No
		Release time, speed	00:00:10, Bottom mix
	Mixing / heating:	Mixing time, speed	00:05:00, Half mix
		Heating during mixing	No
	End of step	Postmix	No
		Collect count	5
		Collect time [s]	30
	3rd Wash EtOH 80	3rd Wash EtOH 80	
	Beginning of step	Precollect	No
		Release time, speed	00:00:10, Bottom mix
	Mixing / heating:	Mixing time, speed	00:05:00, Half mix
		Heating during mixing	No
	End of step	Postmix	No
		Collect count	5
		Collect time [s]	30
	4th Wash MC5	4th Wash MC5	
	Beginning of step	Precollect	No
		Release beads	No
	Mixing / heating:	Mixing time, speed	00:01:00, Slow
		Heating during mixing	No
	End of step	Postmix	No
		Collect beads	No

	Elution	Elution	
	Beginning of step	Precollect	No
		Release time, speed	00:00:30, Bottom mix
	Mixing / heating:	Mixing time, speed	00:07:00, Bottom mix
		Heating during mixing	No
	End of step	Postmix	No
		Collect count	5
		Collect time [s]	30
	Leave	Tip-plate	

Annexe 5 - Programme d'extraction pour l'automate KingFisher™ DuoPrime Magnetic Particle Processors (Thermo Fisher Scientific) avec le kit NucleoMag Plant (Macherey Nagel)

Reagent info

A (Binding)		plate	
Name	Well volume [µl]	Total reagent volume [µl]	Type
Binding MC2	400	-	Reagent
Billes magnétiques	30	-	Reagent
Lysat	400	-	Reagent
B (1st Wash MC3)		plate	
Name	Well volume [µl]	Total reagent volume [µl]	Type
MC3	600	-	Reagent
C (2nd Wash MC4)		plate	
Name	Well volume [µl]	Total reagent volume [µl]	Type
MC4	600	-	Reagent
D (3rd Wash EtOH 80%)		plate	
Name	Well volume [µl]	Total reagent volume [µl]	Type
Ethanol 80%	600	-	Reagent
E (4th Wash MC5)		plate	
Name	Well volume [µl]	Total reagent volume [µl]	Type
MC5	600	-	Reagent
F		plate	
Name	Well volume [µl]	Total reagent volume [µl]	Type
-	-	-	-
G		plate	
Name	Well volume [µl]	Total reagent volume [µl]	Type
-	-	-	-
H		plate	
Name	Well volume [µl]	Total reagent volume [µl]	Type
-	-	-	-
A (Elution MC6)		Elution	
Name	Well volume [µl]	Total reagent volume [µl]	Type
MC6	100	-	Reagent

Steps data

 Tip1	KingFisher Duo 12 tip comb		
 Pick-Up	plate	(H)	
 Binding	plate	(A) - Binding	
Beginning of step	Precollect	No	
	Release time, speed	00:00:30, Bottom mix	
Mixing / heating:	Mixing time, speed	00:05:00, Half mix	
	Heating during mixing	No	
End of step	Postmix	No	
	Collect count	5	
	Collect time [s]	30	
	Post-temperature	No	
 1st Wash MC3	plate	(B) - 1st Wash MC3	
Beginning of step	Precollect	No	
	Release time, speed	00:00:20, Bottom mix	
Mixing / heating:	Mixing time, speed	00:05:00, Half mix	
	Heating during mixing	No	
End of step	Postmix	No	
	Collect count	5	
	Collect time [s]	30	
	Post-temperature	No	
 2nd Wash MC4	plate	(C) - 2nd Wash MC4	
Beginning of step	Precollect	No	
	Release time, speed	00:00:10, Bottom mix	
Mixing / heating:	Mixing time, speed	00:05:00, Half mix	
	Heating during mixing	No	
End of step	Postmix	No	
	Collect count	5	
	Collect time [s]	30	
	Post-temperature	No	
 3rd Wash EtOH	plate	(D) - 3rd Wash EtOH 80%	
Beginning of step	Precollect	No	
	Release time, speed	00:00:10, Bottom mix	
Mixing / heating:	Mixing time, speed	00:05:00, Half mix	
	Heating during mixing	No	
End of step	Postmix	No	
	Collect count	5	
	Collect time [s]	30	
	Post-temperature	No	

	4th Wash MC5	plate	(E) - 4th Wash MC5
	Beginning of step	Precollect	No
		Release beads	No
	Mixing / heating:	Mixing time, speed	00:01:00, Slow
		Heating during mixing	No
	End of step	Postmix	No
		Collect beads	No
		Post-temperature	No
	Elution MC6	Elution	(A) - Elution MC6
	Beginning of step	Precollect	No
		Release time, speed	00:00:30, Bottom mix
	Mixing / heating:	Mixing time, speed	00:07:00, Bottom mix
		Heating during mixing	No
	End of step	Postmix	No
		Collect count	5
		Collect time [s]	30
		Post-temperature	No
	Leave	plate	(H)