

Méthode d'analyse en en santé des végétaux

RÉFÉRENCE : ANSES/LSV/MA074 - Version 1

Décembre 2024

Détection par PCR en temps réel de '*Candidatus Phytoplasma palmae*' (groupe 16SrIV), responsable du jaunissement mortel du palmier dans la zone Caraïbes.

Laboratoire de la santé des végétaux

Laboratoire national de référence Mandat « Phytoplasmes sur toutes matrices »

Historique de la méthode

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

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

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

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

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

*La version 1 a fait l'objet d'une consultation du 21 mai au 18 juin 2024 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 (BVO)

Laboratoire National de Référence : **Mandat « Phytoplasmes sur toutes matrices »**

Adresse : 7 rue Jean Dixméras 49044 Angers CEDEX 01

Contact : lsv.ubvo@anses.fr

Le travail d'adaptation et de validation de la présente méthode a été effectué par l'équipe 'Virologie-Phytoplasmiologie' de l'unité BVO du Laboratoire de la Santé des Végétaux et a donné lieu à un Rapport de caractérisation et de validation de la méthode en avril 2024 (Loiseau *et al.*, 2024).

Sommaire

Avant-propos	3
Introduction	5
Avertissements et précautions de sécurité	6
1. Objet et domaine d'application	7
2. Documents de référence	7
3. Termes, sigles et définitions	7
4. Principe de la méthode	7
5. Réactifs	9
5.1. Eau.....	9
5.2. Extraction d'ADN	9
5.3. Oligonucléotides	10
5.4. Kit de PCR en temps réel	10
5.5. Autres consommables à usage unique	10
5.6. Contrôles et témoins.....	11
6. Appareillage et matériels	12
7. Échantillons	14
7.1. Conditions d'acceptation des échantillons	14
7.2. Conservation des échantillons avant analyse	14
7.3. Conservation des échantillons ou reliquats après analyse	14
8. Mode opératoire	16
8.1. Préparation des échantillons pour analyse	16
8.2. Extraction de l'ADN total.....	17
8.3. PCR duplex en temps réel – Amplification des ADN.....	18
9. Résultats	20
9.1 Contrôle de la validité des résultats	20
9.2 Calculs et expression des résultats	20
10. Caractéristiques de performance de la méthode	22
Annexe 1 : Solution et tampon	24
Bibliographie	25

Introduction

Le jaunissement mortel des palmiers ou Lethal Yellowing Type Syndrome (LYTS) est la maladie la plus importante qui affecte actuellement la production de cocotiers dans le monde. L'agent causal principal dans la zone Caraïbes est '*Candidatus Phytoplasma palmae*', phytoplasme du groupe 16SrIV (Bertaccini *et al.*, 2022). A noter qu'en Afrique de l'Ouest et dans d'autres zones du globe, d'autres phytoplasmes (groupes 16Sr différents) sont également responsables de cette maladie (EFSA, 2017).

Les symptômes causés sont notamment un avortement précoce des noix de coco et un jaunissement du feuillage qui va conduire au dépérissement progressif de l'arbre (Figure 1). Le phytoplasme provoque la mort des palmiers infectés entre 3 et 5 mois après l'apparition des premiers symptômes. Il affecte le cocotier et plus de 40 espèces de palmiers (famille des arécacées). Dans les Caraïbes, le seul insecte vecteur connu de cette maladie est *Haplaxius crudus* (EFSA, 2017 ; Pilet *et al.*, 2022).

Dans les régions Caraïbes et Golfe du Mexique, la maladie est présente notamment aux Etats-Unis (Floride et Texas), aux Bahamas, aux îles Caïmans, à Cuba, à la Jamaïque, en République Dominicaine, à Saint Kitts et Nevis, à Antigua, au Mexique, au Honduras, au Guatemala et au Belize (EFSA, 2017). Le premier signalement de la maladie en Guadeloupe date de mars 2021 (Pilet *et al.*, 2022).



Figure 1 : *Cocos nucifera* présentant des symptômes de '*Candidatus Phytoplasma palmae*' du jaunissement à l'arbre mort (©ANSES LSV UBVO)

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.

Les phytoplasmes sont des parasites stricts, les structures cellulaires hôtes sont indispensables à leur survie. Il est donc suffisant de détruire ou de déstructurer les tissus végétaux constituant l'échantillon pour éviter leur maintien et éventuellement leur dissémination. Par ailleurs, les insectes vecteurs peuvent constituer une source de dissémination.

La mise en œuvre de la méthode doit se faire dans le respect des dispositions réglementaires en vigueur au moment de son utilisation.

1. Objet et domaine d'application

La présente méthode permet de détecter '*Candidatus Phytoplasma palmae*' sur plantes hôtes. Elle consiste en une extraction d'ADN suivie d'une PCR en temps réel duplex adaptée de Córdova *et al.* (2014) et Papayiannis *et al.* (2011). Elle amplifie une zone de l'ADN ribosomique 16S, spécifique de '*Ca. P. palmae*', phytoplasme du groupe 16SrIV responsable du jaunissement mortel des palmiers dans la zone Caraïbes, et un contrôle interne 'plante' permettant de valider échantillon par échantillon la qualité et la quantité de l'extrait ADN. Elle s'applique sur plantes, qu'elles soient symptomatiques ou non, généralement sur la sciure de pseudo-tronc mais aussi sur parties de plante riche en phloème (pétiole, fleur).

La méthode décrite est qualitative. Elle permet de détecter la présence de '*Ca. P. palmae*' dans la limite du seuil de détection de la technique employée mais ne permet pas de quantifier la cible dans l'échantillon analysé. Elle ne permet pas la détection des phytoplasmes appartenant à d'autres groupes phylogénétiques pouvant provoquer le 'Lethal Yellowing Type Syndrome' (LYTS) dans d'autres zones géographiques du globe.

2. Documents de référence

- [1] MOA 022 : Techniques qualitatives d'amplification enzymatique des acides nucléiques : PCR (Polymerase Chain Reaction), RT-PCR (Reverse Transcription-PCR) et PCR temps réel. Détection 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 avec un protocole au CTAB (Cetyl TrimethylAmmonium Bromide) ou à l'aide de kits commerciaux dont les performances sont équivalentes (cf. point 5.2). La détection de '*Ca. P. palmae*' se fait ensuite par PCR en temps réel duplex avec l'amplification simultanée d'une zone de l'ADN ribosomique 16S, spécifique de '*Ca. P. palmae*' et d'un contrôle interne 'plante' permettant de valider échantillon par échantillon la qualité et la quantité de l'extrait ADN.

Le principe de la méthode pour la détection de '*Ca. P. palmae*' est présenté dans la figure 2 :

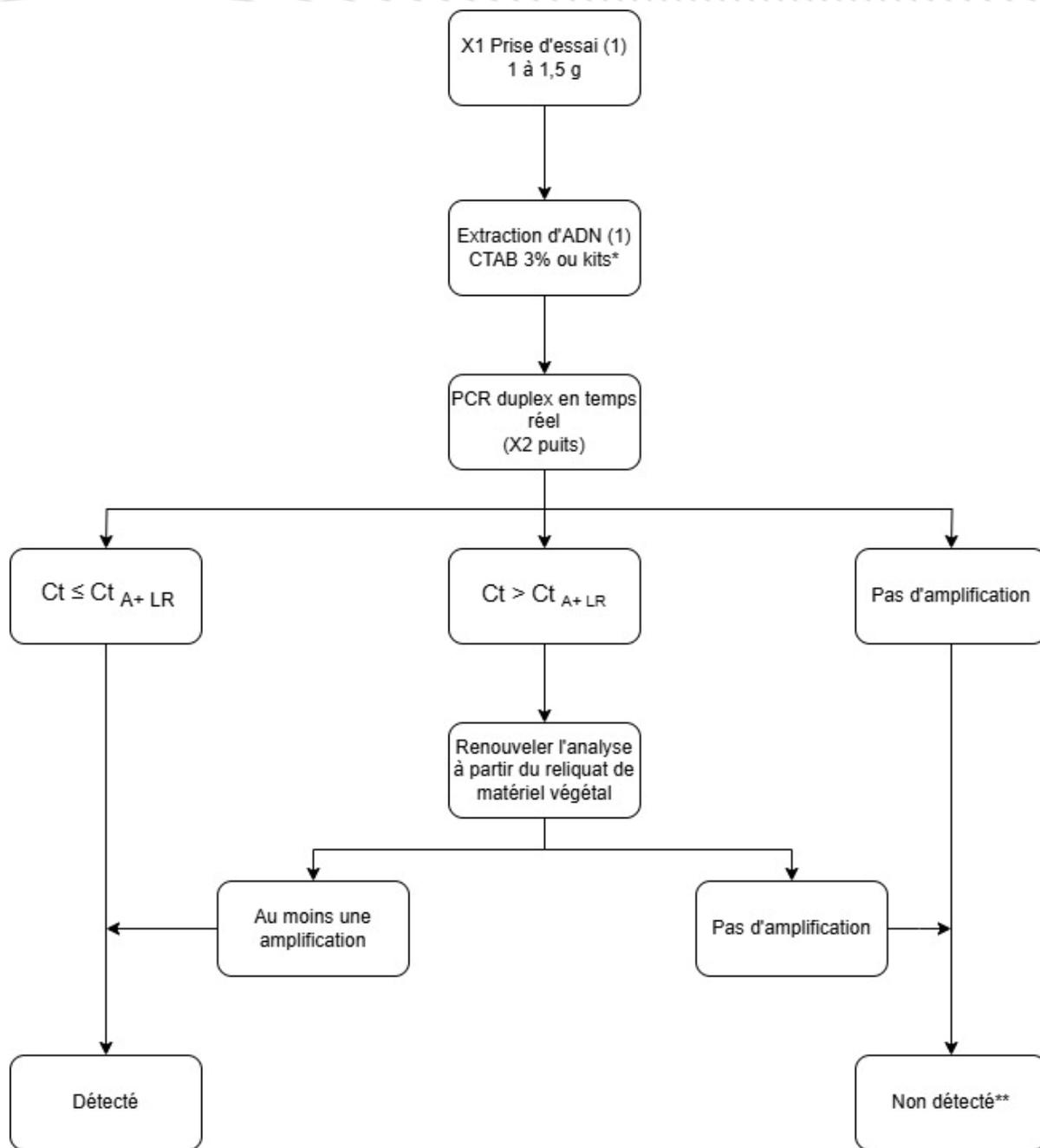


Figure 2 : Schéma de détection de 'Ca. P. palmae'

(1) Conserver le restant de matériel végétal et/ou d'ADN dans les conditions décrites au point 7.3. Sur demande de l'expéditeur, l'analyse peut être reprise soit à partir du reliquat de matériel végétal soit à partir de l'extrait végétal ;

A+ LR : Témoin positif de PCR en limite de répétabilité ;

*Des extractions à partir de kits commerciaux ont été testés et ont montré des performances équivalentes à la méthode CTAB (voir § 5.2).

**Le résultat est indéterminé, lorsque le contrôle interne 'plante' produit un résultat non conforme et que la cible 'Ca. P. palmae' n'est pas détectée.

Les règles de validation et d'interprétation des résultats sont détaillées au point 9.

5. Réactifs

Avertissement : Des appellations commerciales ou fournisseurs peuvent être mentionnées dans le descriptif des produits nécessaires à la mise en œuvre de la présente méthode. Ces informations sont données à l'intention des utilisateurs de la méthode et ne signifient nullement que l'Anses recommande l'emploi exclusif de ces produits. Des produits équivalents peuvent être utilisés s'il est démontré qu'ils conduisent aux mêmes résultats.

En règle générale, le manipulateur doit veiller (par l'utilisation de produits et consommables certifiés, 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 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'extraction d'ADN avec le protocole au CTAB (Cetyl TrimethylAmmonium Bromide) 3% est décrit dans cette méthode.

La liste des tampons et produits nécessaires à la mise en œuvre du protocole au CTAB est la suivante :

- tampon de broyage CTAB 3% (annexe 1);
- chloroforme/alcool isoamylique (24:1) (qualité biologie moléculaire - annexe 1);
- isopropanol;
- éthanol à 70%;

Les kits commerciaux NucleoMag Plant (Macherey-Nagel) et DNeasy Plant Mini (Qiagen) testés et évalués en parallèle de l'extraction CTAB ont obtenus des performances équivalentes et peuvent être utilisés selon les recommandations du fournisseur.

5.3. Oligonucléotides

Cible	Référence	Zone cible	Nom amorces/sondes	Séquences
'Ca. P. palmae'	Córdova <i>et al.</i> (2014)	ADN ribosomique 16S	LY16S-LSF LY16S-LSR LYTS-Probe	5'- GCT AAA GTC CCC ACC ATA ACG T -3' 5'- CGT GTC GTG AGA TGT TAG GTT AAG T -3' 5'- FAM-CCC CTG TCG TTA ATT G-BHQ1 ⁽¹⁾ -3'
Plante	Papayiannis <i>et al.</i> (2011)	Gène de la cytochrome oxydase	CyOXID-F CyOXID-R CyOXID-TAQ	5'- TGG TAA TTG GTC TGT TCC GAT T -3' 5'- TGG AGG CAA CAA CCA GAA TG -3' 5'- Cy5-ATA GGT GCG CCT GAC ATG GCA TTT CCA CA-BHQ2 ⁽¹⁾ -3'

(1) : BHQ1 / BHQ2 = Black hole quencher®

Les amorces doivent être au minimum de qualité RP cartridge et la sonde de qualité HPLC (exemples des critères de qualité du fournisseur Eurogentec). Dans le cas où d'autres fournisseurs proposent des critères de qualité différents, le laboratoire doit s'assurer de l'équivalence du niveau de performance.

Les fluorophores utilisés pour chaque sonde peuvent être modifiés, sous réserve que :

- pour chaque sonde le fluorophore extincteur soit adapté au rapporteur associé ;
- d'une sonde à l'autre les fluorophores rapporteurs soient différents ;
- l'appareil de PCR en temps réel employé soit compatible.

5.4. Kit de PCR en temps réel

La présente méthode a été caractérisée et validée par le Laboratoire National de Référence (LNR) avec le kit QuantiTect® Multiplex PCR NoROX Kit (Qiagen) référence catalogue Qiagen octobre 2022 n° 204743.

D'autres pré-mix ou kits commerciaux de PCR peuvent toutefois être utilisés, pourvu qu'ils aient démontré d'égales performances de sensibilité et de spécificité lors d'essais préliminaires effectués sur des extraits d'ADN totaux d'arécacées reconnues « contaminées » par la cible 'Ca. P. palmae', dans les conditions d'utilisation décrites par la présente méthode.

5.5. Autres consommables à usage unique

- Cônes à filtre pour pipettes de volumes adaptés.
- Microtubes stériles 1,5 mL et 2 mL en fonction des étapes des protocoles.
- Microtubes ou capillaires (qualité biologie moléculaire) de volume adapté au thermocycleur temps réel utilisé, à paroi fine, en barrette de 4 ou 8 puits ou en plaque de 96 puits.
- Sachet de broyage en plastique, muni d'une gaze de filtration à mailles en nylon.

Parmi les consommables spécifiques, il convient d'utiliser des consommables exempts de RNase et DNase et des cônes de prélèvement avec filtre.

Les plastiques utilisés lors de l'amplification doivent être recommandés pour une utilisation en PCR en temps réel (plastique non fluorescent, bouchons optiquement clairs). Les gants sont non poudrés.

5.6. Contrôles et témoins

La technique de détection de régions cibles d'ADN d'un organisme par la technique de PCR en temps réel requiert l'utilisation d'une série de contrôles et témoins permettant de valider la bonne qualité de la manipulation. Ces contrôles et témoins ont différentes fonctions et leur utilisation permet de garantir que :

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

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

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

Témoin négatif de processus (en général « P- »)

Tampon d'extraction soumis à toutes les étapes de l'extraction (1 extrait au minimum). Il permet de vérifier qu'aucune contamination n'ait lieu dès la phase d'extraction.

Témoin positif d'extraction (en général « E+ »)

Echantillon d'arécacée reconnue « contaminée » par la cible 'Ca. P. palmae' et soumis à toutes les étapes dès l'extraction (1 extrait au minimum). Il permet de contrôler la qualité de la manipulation ainsi que le bon fonctionnement du matériel.

Témoin négatif de PCR (en général « A - »)

Réaction de PCR réalisée avec de l'eau ultra pure et/ou mélange réactionnel exempt d'ADN et d'inhibiteur de PCR (1 puits au minimum).

Témoin positif de PCR (en général « A + »)

Réaction de PCR contenant les séquences d'ADN cibles (« Ca. P. palmae' » et « plante ») (1 puits au minimum).

Témoin positif de PCR en limite de répétabilité (Dilution d'ADN reconnu positif pour la cible « Ca. P. palmae » - en général « A+ LR »)

Il peut être réalisé à l'aide d'une gamme de dilution dans de l'ADN d'arécachée saine et correspond à la dilution la plus importante d'ADN reconnu positif pour laquelle 6 puits PCR sur 6 donnent un résultat positif pour la détection de 'Ca. P. palmae'. Ce témoin doit être caractérisé par le laboratoire dans ses propres conditions.

Il permet de vérifier que la réaction de PCR s'est déroulée de façon optimale en assurant que la plus petite quantité d'acides nucléiques cibles est détectable de façon répétable par la méthode dans les conditions de l'essai (1 puits au minimum). Le A+LR peut se substituer au A+.

6. Appareillage et matériels

Avertissement : Des appellations commerciales ou fournisseurs peuvent être mentionnées dans le descriptif des appareils et matériels nécessaires à la mise en œuvre de la présente méthode. Ces informations sont données à l'intention des utilisateurs de la méthode et ne signifient nullement que l'Anses recommande l'emploi exclusif de ces matériels. Des matériels équivalents peuvent être utilisés s'il est démontré qu'ils conduisent aux mêmes résultats.

L'agencement et l'équipement des zones de travail sont définis dans la MOA 022 version en vigueur. Les matériels utilisés dans la méthode doivent satisfaire aux exigences de la MOA 022 version en vigueur.

Afin d'alléger la lecture de la méthode, seules les valeurs cibles des grandeurs mesurées sont indiquées dans le corps du texte, en unités du système international ou unités dérivées. Les erreurs maximales tolérées (EMT) à prendre en considération sont données dans le tableau 1 ci-après (dans le cas contraire, des spécifications sont précisées dans le texte de la méthode).

Tableau 1 : 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 = $\pm 4^{\circ}\text{C}$ (ou plus strict en fonction des recommandations fournisseur) Congélateur : $\leq -18^{\circ}\text{C}$

Thermocycleur : La vérification de l'aptitude à l'usage attendu se fera sur la base des résultats obtenus par le biais d'un test biologique et/ou d'une 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... ;
- Presse pneumatique ou autre système de presse pourvu qu'il permette d'obtenir un écrasement équivalent et limite les risques de contamination ;
- 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 selon le protocole CTAB

- Hotte chimique ou sorbonne
- Verrerie pour les préparations et le stockage (flacons bouchonnés et éprouvettes) pouvant être autoclavée ;
- pH-mètre ;
- Centrifugeuse permettant d'atteindre une force centrifuge relative d'environ 1000 à 13000 g et rotor adapté pouvant recevoir des tubes plastiques de 1,5 et 2 mL
- Thermobloc ou bain-à-sec ou incubateur (température 65°C) (pour la lyse cellulaire)
- Agitateur de tubes de type Vortex.

En cas d'utilisation d'un kit commercial, se référer aux recommandations du fournisseur.

Equipement pour l'amplification

- Appareil de PCR en temps réel et ordinateur de pilotage capables de mesurer la fluorescence des rapporteurs utilisés (par exemple, ceux des sondes décrites au point 5.3, FAM et Cy5).

NB : Différents équipements ont été utilisés au cours de la validation de la méthode. Les caractéristiques de performance présentées au point 10 ont été obtenues sur le thermocycleur Quant Studio 5 Real Time PCR System (QS5 – Applied Biosystems) pour les données d'inclusivité et sur le thermocycleur AriaMx (Agilent) pour les données de sensibilité analytique et de répétabilité.

Stockage des échantillons et des ADN

- Congélateur (température $\leq -18^{\circ}\text{C}$)
- Réfrigérateur (température = 5°C)

7. Échantillons

7.1. Conditions d'acceptation des échantillons

Le laboratoire reçoit des échantillons d'au moins 1 g de matériel végétal frais. En dessous d'1g de matériel végétal, des réserves sont émises quant au résultat d'analyse si ce dernier est négatif.

Les échantillons reçus pour analyse doivent être dans un bon état de conservation, c'est-à-dire, ni en cours de décomposition, ni trop oxydés, ni présenter de moisissures. Chaque échantillon doit être conditionné individuellement dans un emballage hermétique et parfaitement identifié (référence figurant sur la fiche de demande d'analyse). Dans le cas contraire, le laboratoire émet des réserves sur l'acceptabilité de l'échantillon, en précisant l'état dégradé de l'échantillon à la réception au laboratoire ou les risques d'atteinte à son intégrité. Si les échantillons arrivent dans un état trop dégradé ou non identifiable, le laboratoire peut refuser l'analyse. Le refus d'analyse doit être motivé et doit être notifié au client dans les plus brefs délais.

7.2. Conservation des échantillons avant analyse

Le délai maximum entre la réception de l'échantillon et le début effectif de l'analyse (Prise d'essai) doit être le plus court possible 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 (voir tableau 2), 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 à un autre laboratoire agréé ou 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 2.

Tableau 2 : Conditions de conservation des échantillons

Etapas	Type de reliquat	Conservation			Modalités d'envoi à un autre laboratoire le cas échéant
		Résultat	Durée après envoi du rapport	Conditions	
Echantillon ou Prise d'essai	Sciure	Négatif	15 jours	+5°C en tube Falcon™ avec silica gel en sachet ou à température ambiante après lyophilisation	Tube Falcon™ avec silica gel en sachet et clairement identifiés Température ambiante Transporteur rapide
		Autre que négatif	12 mois		
	Autres matrices	Négatif	15 jours	≤-18°C ou à température ambiante après lyophilisation	Sachets / Tubes / pots fermés hermétiquement et clairement identifiés Bloc froid Transporteur rapide
		Autre que négatif	12 mois		
Broyage	Broyat	Négatif	15 jours	≤-18°C	Sachets / Tubes / pots fermés hermétiquement et clairement identifiés Bloc froid Transporteur rapide
		Autre que négatif	12 mois		
Extraction d'ADN	Extraits d'ADN	Négatif	15 jours	≤-18°C	Tubes hermétiques clairement identifiés Température ambiante Transporteur rapide
		Autre que négatif	12 mois		

8. Mode opératoire

8.1. Préparation des échantillons pour analyse

Pour la sciure de pseudo-tronc, réaliser une prise d'essai correspondant à 1 à 1,5 g de sciure (Figure 3). Il n'est pas nécessaire de réaliser une 2nde prise d'essai dans le cas où il faille renouveler l'analyse car les échantillons sont transmis sur gel de silice qui permet une conservation correcte au réfrigérateur.



Figure 3 : Prise d'essai de sciure de pseudo-tronc de palmacées ou arecaceae (©ANSES LSV UBVO).

Pour les autres matrices, prélever et peser 1 à 1,5 g de matériel végétal dans la zone où le phloème est le plus abondant (pétioles débarrassés des premières couches 'ligneuses' de tissus, pédicelles pour les inflorescences...). Faire une 2nde prise d'essai en cas de besoin de renouveler l'analyse.

Déposer la prise d'essai dans un sac de broyage en plastique (avec gaze pour la filtration des particules grossières).

Entre chaque échantillon, décontaminer les zones de la pailasse ou/et les outils en contact avec le végétal avec de l'hypochlorite de sodium (2,6% de chlore actif) ou un produit similaire afin d'éviter les contaminations croisées (élimination des traces d'ADN).

Remarque : Il est possible d'arrêter momentanément l'analyse à ce stade en conservant les prélèvements au réfrigérateur pendant 24 à 48 h ou au congélateur pour une durée supérieure à 48h.

Les reliquats d'échantillons sont conservés selon les modalités définies dans le tableau 2.

8.2. Extraction de l'ADN total

Broyage

Le ratio poids de tissu végétal / volume de tampon de broyage est d'environ 1 g de tissu végétal dans 10 mL de tampon de broyage (tampon CTAB 3% - voir annexe 1).

Les tissus végétaux constituant la prise d'analyse sont écrasés en présence du tampon de broyage puis sont broyés. Les tissus végétaux doivent être fragmentés finement et de manière homogène.



Figure 4 : Broyage d'un prélèvement de sciure (©ANSES LSV UBVO).

Dénaturation des membranes et libération de l'ADN des phytoplasmes

Transférer 1 mL de broyat dans un tube de 2 mL.

Incuber pendant environ 20 min à 65°C afin de permettre la dénaturation des membranes par le CTAB.

Purification

Ajouter sous la sorbonne 1 mL d'une solution de chloroforme/alcool isoamylique (ratio 24:1) (voir annexe 1).

Agiter vigoureusement jusqu'à obtenir une émulsion (chloroforme insoluble).

Centrifuger environ 5 min à 13000 g environ pour faire précipiter les protéines (température ambiante).

Précipitation

Après purification, transférer environ 750 µL de la phase aqueuse supérieure (ne pas prélever l'interface) dans un tube de 1,5 mL (valeur indicative).

Ajouter 750 µL d'isopropanol glacé (conservé au congélateur).

Agiter lentement par retournements du tube jusqu'à homogénéisation.

Remarque : Il est possible d'arrêter momentanément l'analyse à ce stade en conservant les tubes au congélateur.

Centrifuger environ 5 min à 13000 g environ pour précipiter l'ADN (contrôle visuel possible).

Rinçage de l'ADN

Éliminer délicatement le surnageant, attention à ne pas perdre le culot d'ADN (parfois un contrôle visuel est possible).

Laver le culot avec 1 mL d'éthanol 70%, agiter par retournement (ADN insoluble) puis centrifuger environ 5 min à 13000 g environ.

Éliminer délicatement l'alcool puis sécher le culot. L'élimination de l'alcool et le séchage de l'ADN peuvent être facilités par l'utilisation d'un appareil du type concentrateur (évaporation sous vide partiel avec centrifugation pour "regrouper" l'ADN).

Conditionnement des extraits

Le culot d'ADN est dissout dans environ 100 µL d'eau ultra pure. L'ADN est prêt à être amplifié.

Les suspensions d'ADN peuvent être conservées de l'ordre de 6 à 8 jours au réfrigérateur ou doivent être congelées si l'utilisation est plus tardive.

8.3. PCR duplex en temps réel – Amplification des ADN

L'amplification nécessite 2 couples d'amorces (cf. point 5.3), le premier étant spécifique de 'Ca. P. palmae', le 2nd permettant l'amplification d'une partie du génome de la plante. Ce dernier correspond à un contrôle positif interne endogène plante et il permet la validation du bon état de l'échantillon, de l'étape d'extraction et de la PCR (voir point 9.2.). A chacun de ces couples est associée une sonde permettant la mise en évidence d'une éventuelle amplification (cf. point 5.3).

Chaque extrait est amplifié en double.

Préparation et distribution du mélange réactionnel

La composition du mélange réactionnel pour l'amplification par PCR duplex en temps réel pour la détection de 'Ca. P. palmae' est présentée dans le tableau 3 :

Tableau 3 : Composition du mélange réactionnel pour amplification par PCR duplex en temps réel

Réactifs	Concentration finale	A titre indicatif	
		Concentration initiale	Volume/microtube (en μL)
eau ultra pure			5,4
QuantiTect® Multiplex PCR NoROX Kit (Qiagen)	1X	2X	10
amorces LY16S-LSF	0,3 μM	10 μM	0,6
amorces LY16S-LSR	0,3 μM	10 μM	0,6
sonde LYTS-Probe	0,2 μM	10 μM	0,4
amorces CyOXID-F	0,2 μM	10 μM	0,4
amorces CyOXID-R	0,2 μM	10 μM	0,4
sonde CyOXID-TAQ	0,1 μM	10 μM	0,2
Mélange réactionnel			18 μL
Volume échantillon			2 μL
Volume final			20 μL

Conditions de PCR

Les différents paramètres de l'amplification par PCR duplex en temps réel pour la détection de 'Ca. P. palmae' sont présentés dans le tableau 4 :

Tableau 4 : Paramètres d'amplification

	Températures	Temps	Nombre de cycles
Activation*	95°C	15 min	1 cycle
Dénaturation	95°C	15 s	40 cycles
Hybridation et Elongation**	60°C	60 s	

*La température et la durée d'activation de l'ADN polymérase dépendent du kit enzymatique utilisé.

**L'acquisition de fluorescence émise se fait généralement à chaque cycle en fin de phase d'élongation.

9. Résultats

Pour la détermination de la ligne de seuil (threshold), il est recommandé d'utiliser la détermination automatique réalisée avec le logiciel du thermocycleur.

Une valeur de Ct doit être accompagnée d'une courbe de type exponentiel (en échelle linéaire et exponentielle) pour être prise en compte.

9.1 Contrôle de la validité des résultats

La validation de l'analyse s'effectue en observant les courbes de fluorescence mesurées par l'appareil de PCR en temps réel et générées à partir des différents témoins. Une série d'analyses (même réaction de PCR) est considérée validée si et seulement si l'ensemble des conditions ci-après est réuni :

- Le témoin négatif de processus n'a pas généré de courbe de fluorescence caractéristique, ni de valeur de Ct pour la cible 'Ca. P. palmae' et pour la cible 'Plante', ou bien une valeur de Ct \geq à 33 pour la cible 'Plante'.
- Le témoin négatif de PCR n'a pas généré de courbe de fluorescence caractéristique, ni de valeur de Ct pour la cible 'Ca. P. palmae' et pour la cible 'Plante'.
- Le témoin positif d'extraction, le témoin positif de PCR et le témoin en limite de répétabilité ont généré une courbe de fluorescence de type exponentiel et une valeur de Ct inférieur à 40 pour la cible 'Ca. P. palmae'.

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

9.2 Calculs et expression des résultats

Si la série d'analyses est validée, les résultats peuvent être considérés comme interprétables pour l'ensemble des prises d'essai testées au cours de la même réaction de PCR.

La valeur du Ct du témoin positif à la limite de répétabilité (A+ LR) : Ct A+LR est établie à chacune des séries d'amplification (« run »). Elle permet l'interprétation des résultats des échantillons analysés dans la série.

Interprétation des résultats

Pour chaque échantillon, lorsqu'une augmentation exponentielle de la fluorescence est observée pour la cible 'Ca. P. palmae', le résultat est considéré en fonction du seuil de répétabilité (voir tableau 5).

Tableau 5 : Règles d'interprétation des résultats de PCR pour la détection de '*Candidatus Phytoplasma palmae*'

Résultat ' <i>Ca. P. palmae</i> '		Amplification 'Plante'	
Puits 1	Puits 2	Ct 'Plante' ≤ 24	Ct 'Plante' > 24
+	+	'Ca. P. palmae' détecté	
-	-	'Ca. P. palmae' non détecté	
(+)	(+) ou -	Renouveler l'analyse à partir du matériel végétal, ou, le cas échéant, de l'extrait ADN. A l'issue du renouvellement : - Au moins une amplification ' <i>Ca. P. palmae</i> ', ' Ca. P. palmae' détecté - Si pas d'amplification ' <i>Ca. P. palmae</i> ', ' Ca. P. palmae' non détecté	Indéterminé Si possible, l'extraction doit être renouvelée, ou, le cas échéant l'amplification.
+	-	Renouveler l'amplification. A l'issue du renouvellement : - Au moins une amplification ' <i>Ca. P. palmae</i> ', ' Ca. P. palmae' détecté - Si pas d'amplification ' <i>Ca. P. palmae</i> ', ' Ca. P. palmae' non détecté	

+ : Courbe de fluorescence exponentielle ET Ct (Cycle treshold) ≤ Ct A+LR ;

- : Absence de courbe caractéristique (No Ct) ;

(+) : Courbe de fluorescence exponentielle ET Ct > Ct A+LR

Formulation des résultats

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

La référence de la méthode d'analyse utilisée sera mentionnée, par exemple: « Détection de '*Candidatus Phytoplasma palmae*' par PCR sur plantes - méthode MA074 ».

10. Caractéristiques de performance de la méthode

Le tableau ci-dessous présente la synthèse des caractéristiques techniques de performance de la méthode de PCR en temps réel pour la détection de '*Candidatus Phytoplasma palmae*' (groupe 16SrIV), responsable du jaunissement mortel du palmier dans la zone Caraïbes.

Tableau 7 : Synthèse des caractéristiques de performance de la MA074

Caractéristique	Paramètre	Valeur ou résultat obtenu lors de la caractérisation	Principales informations relatives aux modalités de réalisation de la caractérisation
Inclusivité / Sensibilité relative	Pourcentage d'échantillons détectés positifs parmi les cibles.	100%	<p>23 extraits ADN de différentes arécacées (<i>Cocos nucifera</i>, <i>Washingtonia</i> sp., <i>Phoenix dactylifera</i>, <i>P. canariensis</i>, <i>P. sylvestris</i>, <i>W. filifera</i>, <i>Trachycarpus fortunei</i>, <i>Adonidia merillii</i>, <i>Red Malayan Dwarf</i>, <i>Sabal palmetto</i>) contaminées par des phytoplasmes du groupe 16SrIV (sous-groupes présents dans la zone Caraïbes), '<i>Ca. P. palmae</i>' provenant de différentes zones des Caraïbes ou du Golfe du Mexique (Guadeloupe, Floride et Louisiane).</p> <p>Chaque extrait a été testé 3 fois.</p>
Exclusivité / Spécificité relative	Pourcentage d'échantillons testés négatifs parmi les non cibles.	100%	<p>17 extraits ADN d'arécacées considérées comme saines (<i>Cocos nucifera</i>, <i>Washingtonia robusta</i>, <i>Phoenix dactylifera</i>, <i>P. canariensis</i>, <i>P. sylvestris</i>, <i>W. filifera</i>, <i>Trachycarpus fortunei</i>, <i>Adonidia merrillii</i>, <i>Roystonea regia</i>, <i>Hyophorbe verschaffeltii</i>), de 8 extraits ADN de plantes contaminées par des phytoplasmes proches (groupe 16SrIV-C) ou ayant été signalés dans la littérature scientifique comme pouvant provoqués des symptômes de jaunissement mortel du palmier (16SrXXII-A, 16SrXXII-B, '<i>Ca. P. dypsidis</i>', '<i>Ca. P. pini</i>', '<i>Ca. P. cynodontis</i>') et d'un extrait ADN de cocotier contaminé par <i>Bacillus megaterium</i></p> <p>Chaque extrait a été testé 3 fois.</p>

Caractéristique	Paramètre	Valeur ou résultat obtenu lors de la caractérisation	Principales informations relatives aux modalités de réalisation de la caractérisation
Exactitude	Etroitesse de l'accord entre le résultat d'essai et la valeur de référence acceptée	100%	Synthèse des données de sensibilité et spécificité relative
Sensibilité analytique	Niveau de dilution le plus important pour lequel l'ensemble des répétitions est positif.	<p>Sur matrice '<i>Palmier sp.</i>' : 1×10^{-2} (166,5 copies/μL)</p> <p>Sur matrice '<i>Cocos nucifera</i>' : 1×10^{-4} (18,5 copies/μL)</p>	Gamme de dilution à 5 niveaux de broyat positif pour ' <i>Candidatus Phytoplasma palmae</i> ' dans du broyat de <i>Palmier sp.</i> d'une part et <i>Cocos nucifera</i> d'autre part. Chaque niveau a été extrait 6 fois et chacun des extraits ADN a été testé 2 fois.
Répétabilité	Etroitesse d'accord entre des résultats successifs et indépendants obtenus avec un matériel d'essai identique dans des conditions identiques.	89%	

Annexe 1 : Solution et tampon

Tampon d'extraction CTAB 3%

Nom produit	Quantité pour 1L
Cethyl trimethylammonium bromide ou bromure d'hexadécyltriméthylammonium (CTAB)	30 g
Chlorure de sodium (NaCl)	81,81 g
Ethylene diamine tetraacetic acid (EDTA)*	7,44 g
2-amino-2-(hydroxyméthyl)-1,3-propanediol, hydrochloride (Tris-HCl ou Trizma base)	12,1 g
eau déminéralisée	700 mL
Ajuster le pH à 8**	
eau déminéralisée	Qsp 1L

*Peut être remplacé par de l'EDTA disodique dihydraté

** Ajuster le pH avec environ 20 mL d'HCl concentré si utilisation du Trizma base ou avec du NaOH pur si utilisation du Tris-HCl

Chloroforme/Alcool isoamylique 24:1

Nom produit	Quantité
Chloroforme	24 mL
Alcool isoamylique	1 mL

Bibliographie

Bertaccini, A., Y. Arocha-Rosete, N. Contaldo, B. Duduk, N. Fiore, H. G. Montano, M. Kube, C. H. Kuo, M. Martini, K. Oshima, F. Quaglino, B. Schneider, W. Wei, and A. Zamorano, 2022. Revision of the 'Candidatus Phytoplasma' species description guidelines. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* **72** (4).

Córdova, I, C Oropeza, C Puch-Hau, N Harrison, A Collí-Rodríguez, M Narvaez, G Nic-Matos, C Reyes, and L Sáenz, 2014. A real-time PCR assay for detection of coconut lethal yellowing phytoplasmas of group 16SrIV subgroups A, D and E found in the Americas. *Journal of Plant Pathology* **96** (2): 343-352.

EFSA Panel on Plant Health, M. Jeger, C. Bragard, T. Candresse, E. Chatzivassiliou, K. Dehnen-Schmutz, G. Gilioli, J.-C. Gregoire, J. A. J. Miret, A. MacLeod, M. Navajas Navarro, B. Niere, S. Parnell, R. Potting, T. Rafoss, V. Rossi, G. Urek, A. Van Bruggen, W. Van der Werf, J. West, S. Winter, M. Dickinson, C. Marzachi, G. Hollo, and D. Caffier, 2017. Pest categorisation of Palm lethal yellowing phytoplasmas. *EFSA Journal* **15** (10): e05028-n/a. <https://doi.org/10.2903/j.efsa.2017.5028>.

Loiseau, M., Cousseau-Suhard, P., Rolland, M. (2024). Rapport de caractérisation et de validation d'une méthode d'analyse : Détection de 'Candidatus Phytoplasma palmae' (groupe 16SrIV), responsable du jaunissement mortel du palmier dans la zone Caraïbes, par PCR en temps réel. Version 02.

Papayiannis, Lambros C., Ivi S. Harkou, Yiannis M. Markou, Christos N. Demetriou, and Nikolaos I. Katis. 2011. Rapid discrimination of Tomato chlorosis virus, Tomato infectious chlorosis virus and co-amplification of plant internal control using real-time RT-PCR. *Journal of virological methods* **176** (1-2): 53-59.

Pilet, F., M. Loiseau, C. Boyer, A. Cavalier, and C. Diman, 2022. First report of 'Candidatus Phytoplasma palmae' (16SrIV-A subgroup) associated with palm Lethal Yellowing disease on *Cocos nucifera* and *Pritchardia* sp. in Guadeloupe, French West Indies. *Plant Disease* **107** (5): 1621. <https://doi.org/10.1094/PDIS-08-22-1898-PDN>.

