

Méthode d'analyse en santé des végétaux

RÉFÉRENCE : ANSES/LSV/MA075- Version 1

Consultation

Détection de *Ceratocystis platani* par PCR en temps réel

Laboratoire de la santé des végétaux

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

Historique de la méthode

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

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

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

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

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

* La version 1 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 développée par :

Anses - Laboratoire de la Santé des Végétaux, Unité de Mycologie

Laboratoire National de Référence Champignons phytopathogènes sur toute matrice

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

Contact : nancy.lsv@anses.fr

Le travail de relecture a été effectué par la direction du Laboratoire de la Santé des Végétaux.

Les échantillons naturellement contaminés qui ont permis de valider cette méthode ont été fournis par la FREDON Auvergne-Rhône Alpes, la FREDON Occitanie et Mr Francis Maire, arboriste conseil, que nous remercions chaleureusement.

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	9
5. Réactifs	10
5.1 Eau.....	10
5.2 Kits d'extraction d'ADN	10
5.3 Oligonucléotides	10
5.4 Pré-mix de PCR en temps réel	11
5.5 Autres consommables à usage unique	11
5.6 Contrôles et témoins.....	11
6. Appareillage et matériels	13
7. Échantillons	14
7.1 Conditions d'acceptation des échantillons	14
7.2 Conservation des échantillons avant analyse	14
7.3 Conservation des reliquats d'échantillons utilisés :	15
8. Mode opératoire	15
8.1 Préparation des échantillons pour analyse	15
8.2 Broyage des prises d'essai et extraction de l'ADN total	16
8.3 Test de détection par PCR en temps réel	17
9. Résultats	19
9.1 Contrôle de la validité des résultats	19
9.2 Calculs et expression des résultats	19
10. Caractéristiques de performance de la méthode	21
Bibliographie	25
Annexe 1 : Conseils de prélèvement des échantillons au terrain	26
Annexe 2 : Conseils de prélèvement des prises d'essai au laboratoire	27
Annexe 3	28



Introduction

Ceratocystis platani (Walter) Engelbrecht et Harrington est l'agent du chancre coloré du platane. C'est un agent de trachéomycose (dégénérescence du système vasculaire) provoquant de graves dépérissements et entraînant rapidement la mort des arbres (3 à 7 ans). Les arbres atteints sont a priori reconnaissables par leur feuillage clairsemé et jaunâtre, ainsi que par le dépérissement d'une ou plusieurs branches. Le champignon se manifeste sous forme de lésions de l'écorce, reconnaissables à leur aspect de flammèches de couleur bleu-noir ou violette sur le tronc et les branches. Il pénètre principalement par des blessures et gagne l'intérieur de l'arbre par les rayons ligneux et les vaisseaux. Le parasite est transporté par les outils infectés, soit à l'occasion d'élagages ou de taille, soit lors de travaux comme les terrassements. La dissémination peut également s'effectuer par l'intermédiaire des eaux de canaux et de rivière, par simple contact racinaire et à partir de tissus végétaux infectés morts. Il se transmet également d'arbre en arbre par les anastomoses racinaires.

L'objet de cette méthode est de détecter *Ceratocystis platani* dans des tissus ligneux de *Platanus* spp. et à partir de culture pure. La présence de *Ceratocystis platani* est mise en évidence par la technique de PCR temps réel.

Avertissements et précautions de sécurité

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

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

L'exigence de confinement pour la manipulation de formes viables de cet agent pathogène doit être en accord avec la réglementation en vigueur dans la région où se situe le laboratoire d'analyse.

Élimination des matériels susceptibles d'être contaminants :

Le laboratoire doit mettre en œuvre des mesures prenant en compte ces risques pour garantir la non dissémination de l'organisme nuisible dans l'environnement.

Les tubes et autres consommables plastiques ayant été utilisés pendant la phase d'extraction - purification d'ADN total peuvent être éliminés sans traitement particulier (plus de parasite viable à ce stade).

Les tubes et autres consommables plastiques ayant été utilisés lors de la phase de préparation du mélange réactionnel et chargement des solutions d'ADN peuvent être éliminés sans traitement particulier.

1. Objet et domaine d'application

L'objet de cette méthode est de détecter la présence de *Ceratocystis platani* dans les parties superficielles du tronc (écorce et bois sous-cortical) de *Platanus* spp. présentant des symptômes ou à partir de culture pure. La présence de *C. platani* est mise en évidence par un test de détection par PCR (Polymerase Chain Reaction) en temps réel utilisant une combinaison d'amorces et de sondes d'hydrolyse. Cette méthode est qualitative : elle permet de détecter *C. platani* dans la limite du seuil de détection de la technique employée sans objectif de quantification.

Les échantillons pour lesquels une réponse négative est obtenue sont considérés comme indemnes de *C. platani* ou contaminés à un niveau trop faible pour être mis en évidence par la technique utilisée.

Objets susceptibles d'être soumis à analyse :

Cette méthode a été initialement validée sur des cultures pures de *C. platani* ainsi que sur de la sciure, des copeaux de bois ou des sections de carottage issus de platanes infectés (voir dossier de validation du LNR – LSV Unité de mycologie document MIAM022).

Type de prélèvement :

Le prélèvement de tissu pour analyse doit être réalisé dans une zone du tronc présentant des symptômes, à l'aide d'une tarière de Pressler, d'un outil de type ciseau à bois, ou d'une perceuse, afin d'y recueillir un volume de quelques millilitres de copeaux, de carotte ou de sciure. Le tout doit être conditionné dans un sachet plastique épais ou dans un flacon plastique à usage unique (Annexe 1). Le conditionnement doit être parfaitement étanche, afin d'éviter la perte ou la dissémination d'échantillon au cours du transport.

2. Documents de référence

- [1] **MOA 022** : Techniques qualitatives d'amplification enzymatique des acides nucléiques : PCR (Polymerase Chain Reaction), RT-PCR (Reverse Transcription-PCR) et PCR temps réel. Détection des organismes phytopathogènes
- [2] **MOA GLO 001** : glossaire général et technique en vigueur au LNPV.

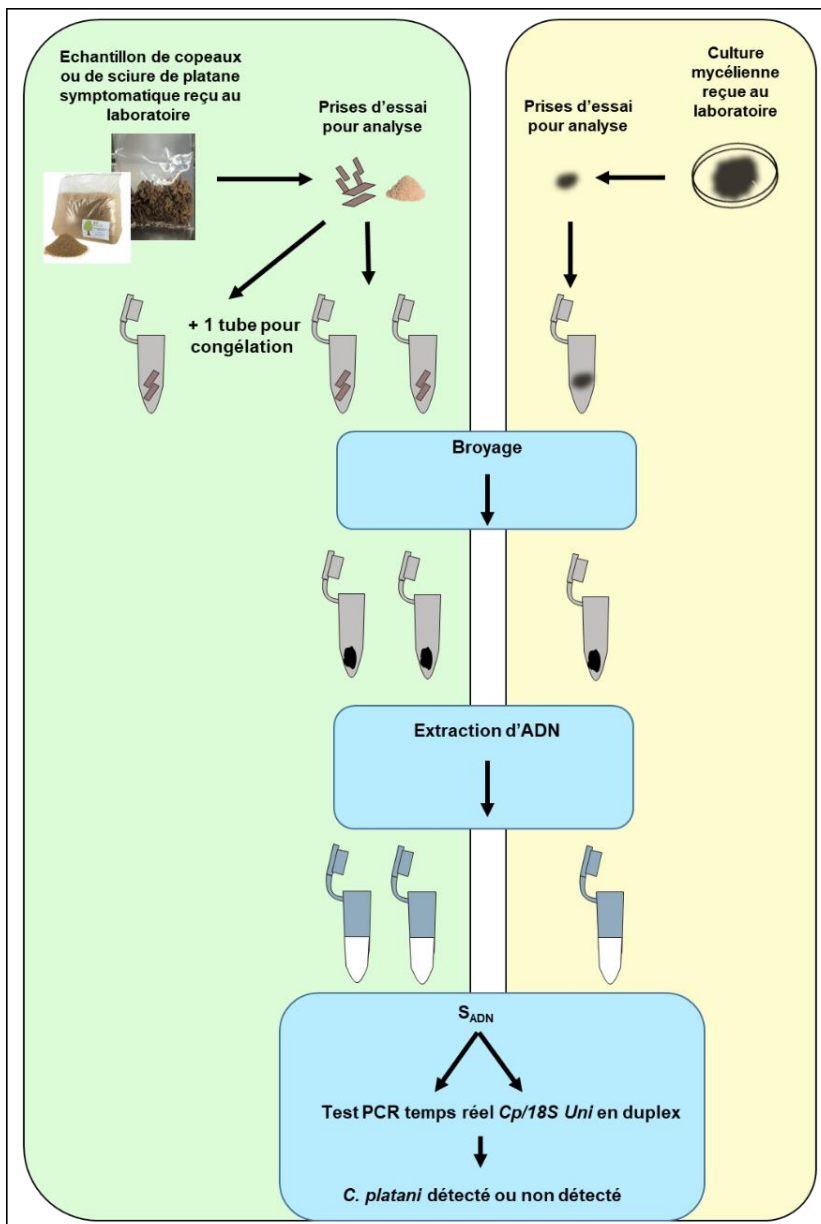
3. Termes, sigles et définitions

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

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

4. Principe de la méthode

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



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. Les résultats originaux de validation sont disponibles dans le dossier de validation MIAM 022 du LNR – LSV unité de mycologie.

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

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

5.1 Eau

L'eau utilisée comme réactif doit présenter une qualité suffisante pour une utilisation en biologie moléculaire.

5.2 Kits d'extraction d'ADN

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

5.3 Oligonucléotides

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

Test	Amorces et sonde	Séquence (5'-3')
Cp ¹	C.P.Sn.For.I	CGTACCTATCTTGTAGTGAGATGAATGC
	C.P.Sn.Rev.I	GAGTTTACAGTGGCGAGACTATACTG
	C.P.TM.Pr	FAM -CGGTGCCCTTCAGAAGGGCCCTACCACC - BHQ ^{®1}
18S Uni ²	18S uni-F	GCAAGGCTGAAACTTAAAGGAA
	18S uni-R	CCACCACCCATAGAATCAAGA
	18S uni-P	JOE -ACGGAAGGGCACCACCAGGAGT- BHQ ^{®1}

¹Pilotti et al, 2012

²loos et al, 2009

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

5.4 Pré-mix de PCR en temps réel

Plusieurs kits d'amplification ont été validés pour cette méthode :

- Takyon No Rox Probe MasterMix blue dTTP (Eurogentec)
- Brilliant II QPCR Master Mix (Agilent)
- PerfeCTa® qPCR ToughMix® (Quantabio)
- Taqman Universal PCR MasterMix (Applied Biosystems)

5.5 Autres consommables à usage unique

- Microcônes stériles à filtre de volume adapté
- Microtubes stériles de 2 mL
- Microtubes ou capillaires stériles pour PCR de volume adapté au thermocycleur temps réel utilisé, à paroi fine, individuels, en barrette de 4, 8 ou en plaque de 96.
- Microtubes de lysing matrix A (MP Biomedicals) ou tout autre consommable permettant d'obtenir une qualité de broyage équivalente pour le broyage de tissus ligneux.
- Microtubes de lysing matrix C (MP Biomedicals) ou microtubes stériles de 2 mL à vis contenant environ 8 mg de billes de verre stérilisées de diamètre de 0.75 à 1 mm (VWR, réf 4122917) ou tout autre consommable permettant d'obtenir une qualité de broyage équivalente pour le broyage des cultures fongiques.

5.6 Contrôles et témoins

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

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

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

- **Un contrôle de la qualité de l'extraction d'ADN et de la présence d'inhibiteurs sera réalisé pour chaque prise d'essai.** Il prendra la forme d'un test PCR temps réel utilisant la combinaison d'amorces / sonde 18S Uni-F/-R/-P (Ioos et al. 2009). Ce test sera réalisé en combinaison avec le test Cp. En revanche, l'analyse des courbes de fluorescence 18S Uni-F/-R/-P se limitera aux données acquises lors des 30 premiers cycles exclusivement. Une solution d'ADN (S_{ADN}) sera dite positive pour le test 18S Uni si le Ct (Cycle threshold, cycle seuil) moyen généré est dans une gamme de Ct acceptable, préalablement déterminée expérimentalement par le laboratoire, sur ce type de matrice dans ses propres conditions.

Dans les conditions de validation de ce test et pour des échantillons de bois de *Platanus spp.* la valeur maximale acceptable de Ct moyen pour le test 18S Uni a été déterminée à 22,52.

- **Un témoin négatif d'extraction ($T_{-extr.}$)** sera préparé pour toute série d'extractions. Une prise d'échantillon "vide" ($=T_{-extr.}$), c'est-à-dire un microtube vide de lysing matrix A ou C de 2 mL stérile, subira donc toutes les phases de l'analyse (prise d'essai-broyage-extraction-PCR) pour vérifier l'absence de contamination lors de la prise d'essai et de la phase d'extraction d'ADN (1er type de faux positif) et sera testé en deux réplicats lors de chaque réaction de PCR en temps réel pour vérifier l'absence de contamination croisée entre échantillons ou de contamination externe lors de la phase d'extraction d'ADN. Le tube faisant fonction de $T_{-extr.}$ doit impérativement être ouvert avant toute manipulation d'échantillons, rester ouvert pendant toute la phase de manipulation des échantillons, et être refermé à la fin de la manipulation des échantillons, et ce, à chaque étape pendant laquelle les tubes d'échantillons doivent être ouverts.
- **Un témoin positif d'amplification plante ($T+_{18S\ Platanus}$)** sera systématiquement testé en deux réplicats lors de chaque réaction de PCR en temps réel. Il permet de vérifier que la réaction PCR 18S Uni s'est effectuée de façon correcte. Ce $T+$ est constitué d'une solution calibrée d'ADN génomique dosée à 1 ng/ μ L obtenue à partir d'un échantillon contaminé par *C. platani*.
- **Un témoin positif d'amplification en limite pratique de détection ($T+_{LOD}$)** sera systématiquement testé en deux réplicats lors de chaque réaction de PCR en temps réel. Il permet de vérifier que la réaction PCR s'est effectuée de façon optimale (conditions thermodynamiques, volumétriques, et chimiques) pour que la plus petite quantité détectable de *C. platani* puisse avoir été détectée dans un échantillon par ce protocole. Ce $T+_{LOD}$ est constitué d'une solution calibrée de plasmides bactériens dans lesquels sont insérées la cible des tests PCR Cp. Ce $T+_{LOD}$ doit être caractérisé par le laboratoire dans ses propres conditions. En pratique, le $T+_{LOD}$ a été ici défini comme la plus petite quantité de cible produisant un résultat positif dans 100 % des cas.

Dans les conditions de validation du LNR, la limite de détection du test a été estimée à 484 copies plasmidiques de cible pour le test Cp par tube de PCR.

- **Un témoin négatif d'amplification (T- ou NTC, no template control)** sera systématiquement introduit en deux réplicats lors de chaque réaction de PCR en temps réel. Une prise d'échantillon "eau" subira donc toutes les phases de l'analyse à partir de la préparation du mélange réactionnel de PCR pour vérifier l'absence de contamination lors de cette phase et lors du chargement des **S_{ADN}** dans les tubes individuels de PCR (2^{ème} type de faux positifs).

Ces contrôles ainsi que des contrôles supplémentaires que le laboratoire peut ajouter si nécessaire sont définis dans la MOA022.

6. Appareillage et matériels

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

L'agencement et l'équipement des zones de travail sont définis dans la MOA 022.

Les matériels utilisés dans la méthode doivent satisfaire aux exigences de la MOA 022 en vigueur.

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

En plus de l'appareillage courant d'un laboratoire de biologie moléculaire, le matériel suivant est jugé nécessaire pour certaines phases de l'analyse :

- Appareil de PCR en temps réel et ordinateur de pilotage capables de mesurer la fluorescence des fluorophores de type « FAM » et « JOE » ou des fluorophores de spectres équivalents. Cette méthode a été validée sur un appareil Rotorgene 6500, Corbett Research/Qiagen.
- Poste de sécurité microbiologique pour la préparation des prises d'essai.
- Cette méthode a été validée en utilisant un broyeur de tissu orbital oscillant (de type Fast Prep, MP Biomedicals) avec adaptateur et portoirs pour tubes de 2 mL. Tout autre système de broyage peut être utilisé, pourvu qu'il permette d'obtenir une qualité de broyage équivalente.
- Hotte à flux laminaire ou poste de sécurité microbiologique pour préparation du mélange réactionnel et chargement des échantillons dans les tubes de PCR (si possible deux hottes ou postes séparés).
- Spatule micro cuillère en acier inoxydable pour le prélèvement des prises d'essai.

7. Échantillons

7.1 Conditions d'acceptation des échantillons

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

Nature et état de l'échantillon compatibles avec l'analyse :

Les échantillons sont constitués de copeaux, de fragments de carotte ou de sciure issus de tissus de platanes présentant des symptômes (cf. Annexe 1). Un échantillon doit représenter un volume approximatif minimal de 1 mL et maximal de 100 mL. Une illustration des prélèvements sur le terrain est disponible en annexe 1.

Les outils utilisés sur le terrain sont désinfectés avant et après chaque prélèvement.

La désinfection peut se faire :

- par trempage dans de l'éthanol à 70% ou à brûler, suivi d'un flambage,
- par trempage dans de l'eau de Javel (ou solution d'hypochlorite de sodium (NaOCl)), diluée et titrée à au moins 1% de Chlore actif, suivi d'un essuyage pour éliminer le désinfectant.

Les échantillons peuvent également être constitués par une culture fongique.

Le temps entre le prélèvement et l'arrivée au laboratoire doit être le plus réduit possible. Si les échantillons ne sont pas envoyés le jour du prélèvement, ils doivent être conservés au froid positif avant l'envoi.

Confection du colis :

Chaque échantillon est conditionné individuellement dans un emballage hermétique (tube ou sachet plastique épais) et parfaitement identifié (référence figurant sur la fiche de demande d'analyse). Toutes les mesures doivent être prises pour conserver l'intégrité de l'échantillon et éviter les contaminations par d'autres échantillons. Une signalétique de type « quarantaine phytosanitaire » doit figurer à l'extérieur du colis.

Fiche de demande d'analyse :

Formulation claire de la demande, identification du végétal, de l'expéditeur, référence des échantillons. Cette fiche est fixée à l'extérieur du colis.

7.2 Conservation des échantillons avant analyse

Le délai entre la réception de l'échantillon et le début effectif de l'analyse doit être inférieur à 15 jours. L'échantillon devra pendant ce temps être conservé à $5^{\circ}\text{C}\pm 3^{\circ}\text{C}$. Les prises d'essai en microtubes peuvent être conservées congelées jusqu'à 6 mois avant analyse.

7.3 Conservation des reliquats d'échantillons utilisés :

Sauf mention contraire explicite ou impossibilité technique avérée, les laboratoires doivent conserver les reliquats pertinents (nature, quantité et qualité) de matériel soumis à analyse, dans des conditions appropriées garantissant leur intégrité, au minimum jusqu'au dixième jour ouvrable suivant l'envoi au demandeur d'un rapport d'analyse concluant à la non mise en évidence de l'organisme recherché. Ce délai imposé est destiné à laisser le temps au demandeur de l'analyse de contester le résultat auprès du laboratoire (ce qui prolonge la conservation du reliquat jusqu'à l'issue de la contestation) et éventuellement de demander une analyse contradictoire.

Dans le cas d'un résultat autre que la non mise en évidence de l'organisme recherché, et sauf indications plus précises dans la méthode, l'ensemble des reliquats pertinents doit être conservé pendant une durée minimale de 12 mois, sauf pour les parties éventuellement transmises à un autre laboratoire agréé ou de référence, à qui est alors transférée la charge de conservation des reliquats. Le laboratoire national de référence peut demander que tout ou une partie de ces reliquats lui soient transmis, aux frais des laboratoires agréés ou reconnus, dans le cadre des missions qui lui sont confiées.

8. Mode opératoire

8.1 Préparation des échantillons pour analyse

Chaque échantillon est traité individuellement et fait l'objet de deux prises d'essai lorsqu'il s'agit de tissus ligneux, d'une seule prise d'essai pour les cultures fongiques. Les prises d'essai se réalisent sous un poste de sécurité microbiologique permettant la réalisation des manipulations en conditions stériles et prévenant tout échappement de l'agent pathogène.

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

- A partir de carottes ou de copeaux de bois, des fragments (maximum d'environ 2 x 2 x 5 mm) sont découpés préférentiellement dans les zones nécrosées si elles sont visibles (biomasse de *C. platani* plus importante à ces endroits) à l'aide d'une lame de scalpel stérile. Ces fragments sont ensuite mélangés, pris aléatoirement et transférés dans deux microtubes de Lysing matrix A, jusqu'à un volume final (tissus plus consommable de broyage) représentant environ 1/4 du microtube (cf Annexe 2).
- A partir de sciure, transférer dans deux microtubes de lysing matrix A une quantité dont le volume maximal représentera environ 1/4 du microtube (cf Annexe 2).
- A partir d'une culture pure, le prélèvement doit s'effectuer sur une culture de moins de 2 mois. Le mycélium sera prélevé en raclant la surface de la culture à l'aide d'une lame de scalpel stérile et placé dans un tube de lysing matrix C ou équivalent. La quantité de mycélium récolté doit correspondre au volume d'une bille d'environ 3-4 mm de diamètre.

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

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

1. Déposer et ouvrir le tube faisant office de témoin négatif d'extraction sur le plan de travail pendant toute la durée de la manipulation des échantillons.
2. Avant ouverture du microtube contenant la prise d'essai, centrifuger brièvement le microtube afin de recueillir toutes les particules constituant l'échantillon au fond du microtube et débarrasser le capuchon de tout reliquat d'échantillon.
3. Ajouter dans chaque microtube de prise d'essai le volume de tampon de lyse préconisé par le fabricant de kit d'extraction d'ADN et environ 15 mg de PVPP. Si un dosage au spectrophotomètre est prévu, il sera parfois nécessaire à cette étape d'ajouter la RNase, enzyme qui dégrade les molécules d'ARN, fournie avec le kit d'extraction. Le volume à ajouter est celui préconisé par le fabricant.
4. Placer les microtubes sur le portoir du broyeur FastPrep et broyer environ 1 minute à 6,5 m/s. Laisser reposer quelques secondes, puis recommencer cette étape une deuxième fois.
5. Centrifuger les microtubes quelques secondes après le broyage pour recueillir l'échantillon au fond du tube et réduire la mousse.
6. Incuber les microtubes entre 15 et 20 min à environ 65°C (ou à la température recommandée par le fabricant de kit d'extraction d'ADN). Pendant l'incubation, vortexer chaque microtube à au moins une reprise pour homogénéiser son contenu qui aura tendance à sédimenter.
7. A la fin de l'incubation centrifuger les microtubes environ 5 min à vitesse maximale. Prélever le surnageant pour poursuivre l'extraction.
8. Le surnageant prélevé est transféré dans un nouveau microtube stérile ou dans la première colonne de filtration du kit d'extraction d'ADN. Le microtube contenant le culot cellulaire est détruit. L'extraction d'ADN se poursuit ensuite en suivant les recommandations du fournisseur du kit d'extraction d'ADN.
9. A la fin du mode opératoire prescrit par le fabricant, l'ADN total issu de chaque prise d'essai est élué dans un volume final de 100 µL de tampon d'éluion. Ces solutions constitueront la solution (extrait) d'ADN directement analysée par PCR en temps réel (S_{ADN}).

8.3 Test de détection par PCR en temps réel

Préparation et distribution du mélange réactionnel de détection

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

PCR temps réel duplex Cp/18S Uni :

Tableau 2 : composition du mélange réactionnel Cp/18S Uni

Composé	Concentration finale
Eau Ultra Pure	qsp 18 μL
Takyon No Rox Probe MasterMix blue dTTP	1x
Amorce sens C.P.Sn.For.I	0.3 μM
Amorce antisens C.P.Sn.Rev.I	0.3 μM
Sonde C.P.TM.Pr	0.1 μM
Amorce sens 18S Uni-F	0.3 μM
Amorce antisens 18S Uni-R	0.3 μM
Sonde 18S Uni-P	0.1 μM

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

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

1. Les différentes solutions S_{ADN} correspondant aux différentes prises d'essai sont testées en deux réplicats (2 tubes ou capillaires PCR individuels) à raison de 2 μL par microtube de PCR à l'aide d'une micropipette munie d'un microcône stérile à embout filtre.
2. Les S_{ADN} des différents contrôles sont ajoutées et testées en deux réplicats : $T_{\text{-extr}}$, $T_{\text{+LOD}}$, etc. Pour le T- (NTC), on substitue à la S_{ADN} 2 μL d'eau ultra pure. Il est recommandé d'ajouter les témoins positifs en fin de manipulation, après avoir refermé de façon étanche les tubes correspondants aux échantillons à tester.
3. Les microtubes sont transférés dans le bloc ou le rotor du thermocycleur.

Paramètres de l'amplification par PCR en temps réel

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

Tableau 5 : programme PCR

Etape		Température de consigne	Durée programmée	Nombre de cycles
1	Dénaturation initiale et activation de la polymérase à ADN*	95 °C	3 min	1
2	Dénaturation	95°C	10 sec	40
3	Hybridation - polymérisation	66°C	60 sec puis mesure de la fluorescence	

*à adapter selon les recommandations du fournisseur de la polymérase ADN

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

9. Résultats

9.1 Contrôle de la validité des résultats

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

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

- a) Aucun des réplicats de T_{extr} n'a généré de fluorescence « FAM » supérieure à la ligne de seuil déterminée => il n'y a pas eu de contamination croisée accidentelle pendant la phase de broyage et d'extraction d'ADN de la série des échantillons analysés ou pendant la préparation du mélange réactionnel, son dépôt et l'ajout des S_{ADN} .
- b) Aucun des réplicats de T- (NTC) n'a généré de fluorescence « FAM » supérieure à la ligne de seuil déterminée => il n'y a pas eu de contamination accidentelle pendant la préparation du mélange réactionnel, son dépôt et l'ajout des S_{ADN} .
- c) Les réplicats de $T_{\text{+LOD}}$ ont chacun généré un niveau de fluorescence « FAM » supérieur à la ligne de seuil déterminée => les conditions de PCR et la composition du mélange réactionnel de PCR ont permis d'amplifier spécifiquement et avec une performance optimale la séquence cible chez *C. platani*.

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

9.2 Calculs et expression des résultats

Si la série d'analyse est validée, les résultats peuvent être considérés comme interprétables pour l'ensemble des S_{ADN} , donc des prises d'essai et de leur deux réplicats testés au cours de la même réaction de PCR.

Pour chacune des réactions de PCR, relever le Ct moyen du contrôle $T_{\text{+LOD}}$ ($=Ct_{\text{LOD}}$) : les extraits d'ADN testés lors de la réaction validée dont le Ct moyen est inférieur ou égal à Ct_{LOD} seront considérés comme positifs.

Chaque prise d'essai est analysée indépendamment l'une de l'autre. Si au moins une prise d'essai est trouvée positive pour la présence de *C. platani*, alors l'échantillon sera déclaré positif pour la présence de *C. platani*.

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

Tableau 6 : PCR duplex Cp/18S Uni réalisées sur S_{ADN}

Test Cp		Test 18S Uni		Décision et résultat
Puits 1	Puits 2	Puits 1	Puits 2	
+	+	n.a.	n.a.	Arrêt de l'analyse : <i>C. platani</i> détecté
-	-	+ ¹	+ ¹	Arrêt de l'analyse : <i>C. platani</i> non détecté au seuil de détection de la méthode
-	-	_2	_2	Refaire la PCR duplex Cp/18S Uni sur S _{ADN} diluée 10 fois et suivre le tableau 7 pour les règles décisionnelles
+	-	+	-	Refaire la PCR duplex Cp/18S Uni, si de nouveau un seul puits sur les deux génère une valeur positive, entreprendre des analyses complémentaires ³

Tableau 7 : PCR duplex Cp/18S Uni réalisées sur S_{ADN} diluée au 1/10e

Test Cp		Test 18S Uni		Décision et résultat
Puits 1	Puits 2	Puits 1	Puits 2	
+	+	n.a.	n.a.	Arrêt de l'analyse : <i>C. platani</i> détecté
-	-	+ ¹	+ ¹	Arrêt de l'analyse : <i>C. platani</i> non détecté au seuil de détection de la méthode
-	-	_2	_2	Arrêt de l'analyse : résultat indéterminé⁴
+	-	+	-	Refaire la PCR duplex Cp/18S Uni, si de nouveau un seul puits sur les deux génère une valeur positive, entreprendre des analyses complémentaires ³

Le diagramme décisionnel simplifié (ne prenant pas en compte les règles à suivre en cas d'amplification pour un seul puits du réplicat) et résumant ces conditions est présenté en annexe 3.

¹ Valeur de Ct 18S Uni échantillon inférieure ou égale au Ct_{seuil} 18S Uni déterminé au laboratoire

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

³ Les analyses complémentaires peuvent par exemple consister en une analyse par PCR temps réel ou conventionnelle ciblant des marqueurs différents, ou par une analyse par barcoding des amplicons obtenus.

⁴ Doser la quantité d'ADN et mentionner la cause de l'indétermination (présence de composés inhibiteurs ou quantité d'ADN extrait insuffisante).

10. Caractéristiques de performance de la méthode

Synthèse des caractéristiques de performance extraite du dossier de validation établi par le LNR « tous champignons sur toutes matrices sauf exceptions mentionnées dans l'arrêté du 30 mars 2023 » sous la référence MIAM 022.

Tableau 8 : synthèse des caractéristiques de performance

Critère de performance	Résultats obtenus
Caractéristiques de la réaction de PCR temps réel	L'efficacité de la réaction du test Cp sur une gamme de solutions plasmidiques calibrées diluées dans du TE (1X), a été évaluée à : -monoplex => 93% ($R^2=0.9687$) -duplex => 95% ($R^2=0.9974$)
Sensibilité analytique	La sensibilité analytique a été évaluée à partir d'une gamme de solution d'ADN plasmidique diluée dans du TE 1X. Pour le test Cp, la sensibilité a été estimée à 484 copies plasmidiques (cp) par tube de PCR.
Spécificité analytique	La spécificité analytique du test a été évaluée <i>in vitro</i> sur 3 isolats de <i>Ceratocystis</i> (<i>C. paradoxa</i> – LSVM0027, LSVM0033 et LSVM0889), et sur 8 isolats de champignons proches de <i>C. platani</i> ou retrouvés fréquemment sur platane (<i>Diplodia mutila</i> – LSVM0316, <i>Neofusicoccum parvum</i> – LSVM0383, <i>Rhizoctonia solani</i> – LSVM0392, <i>Diplodia seriata</i> – LSVM0455, <i>Fomitiporia mediterranea</i> – LSVM0569, <i>Phytophthora citricola</i> – LSVM1386, <i>Macrodiplodiopsis desmazieresii</i> – LSVM1416, <i>Bretziella fagacearum</i> – Br fag 517 et Br fag 927). La spécificité analytique avait été également évaluée sur plusieurs autres espèces fongiques par Pilotti et al (2012) :

Table 2 Fungal organisms, colonizers of *Platanus* wood (CRA-PAV collection) used in this study to test the specificity degree of Real-Time PCR methods developed for *Ceratocystis platani* detection

Code ^a	Fungal species	Accession Nos	Code ^a	Fungal species	Accession Nos
E.L.1	<i>Eutypa lata</i>	AY620998	FB.61	<i>Mycocalicium victoriae</i>	
Cr.Su.1	<i>Cryptosphaeria subcutanea</i>		FB.94	<i>Fusarium solani</i>	
Ella.V.1	<i>Eutypella vitis</i>		FB.74	<i>Arthrinium</i> sp.	
Ella.S.1	<i>Eutypella scoparia</i>		FB.95	Ascomycota	
Bi.Me.1	<i>Biscognauxia mediterranea</i>		FB.23	Ascomycota	
Phom.1	<i>Phomopsis</i> sp.	AY620999	FB.40	Phaeosphaeriaceae	
FB.58	<i>Phoma herbarum</i>		FB.72	Phaeosphaeria sp.	
FB.97	<i>Phoma exigua</i>		FB.30	Dothideomycetes	
FB.103	<i>Phoma macrostoma</i>		FB.50	Dothideomycetes	
FB.38	<i>Phoma</i> sp.		FB.52	Dothideomycetes	
FB.25	<i>Cytospora</i> sp.		FB.91	Dothideomycetes	
FB.13	<i>Phaeoacremonium</i> sp.		FB.80	Pleosporales	
FB.67	<i>Phaeoacremonium rubrigenum</i>		FB.45	Pleosporales	
FB.101	<i>Acremonium strictum</i>		FB.54	Pleosporales	
FB.102	<i>Bionectria ochroleuca</i>		FB.63	Pleosporales	
FB.105	<i>Apiognomonium veneta</i>		FB.82	Pleosporales	
FB.32	<i>Engyodontium album</i>		Fo.Fo.1	<i>Fomes fomentarius</i>	AY849306
FB.33	<i>Phialemonium dimorphosporum</i>		Ch.Pu.1	<i>Chondrostereum purpureum</i>	
FB.35	<i>Peyronellaea glomerata</i>		In.sp.1	<i>Inonotus</i> sp.	
FB.16	<i>Pyrenochaeta</i> sp.		In.sp.2	<i>Inonotus</i> sp.	
FB.43	<i>Nigrospora</i> sp.		F.-FB.A	<i>Fomitiporia mediterranea</i>	AY620997
FB.77	<i>Paraconiothyrium brasiliense</i>		Sp.Pa.1	<i>Spongipellis pachyodon</i>	AY849307
FB.83	<i>Paraconiothyrium</i> sp.		Flla.sp.1	<i>Fomitiporella</i> sp.	
FB.81	<i>Lewia infectoria</i>		Ag.Ae.1	<i>Agrocybe aegerita</i>	
FB.87	<i>Alternaria</i> sp.		Cop.At.1	<i>Coprinopsis atramentaria</i>	
FB.62	<i>Botryosphaeria obtusa</i>		Ga.Re.1	<i>Ganoderma resinaceum</i>	
F.B. 89	<i>Botryosphaeria parva</i>		Au.Am.1	<i>Auriculariopsis ampla</i>	

^a The creators of the isolates (isolation, identification, sequencing and preservation) are the authors of this article; all the isolates were isolated from *Platanus × acerifolia* trees located in the Latium region

Le test est 100% spécifique.

Inclusivité	<p>L'inclusivité du test PCR en temps réel a été démontré <i>in vitro</i> sur 15 isolats de <i>Ceratocystis platani</i> de différentes provenances géographiques.</p> <p>Le test est 100% inclusif.</p>
Répétabilité et reproductibilité	<p>La répétabilité et la reproductibilité ont été évaluées sur 10 réplicats d'une solution plasmidique calibrée, dosée à 2 concentrations proches de la LOD, sur 10 réplicats d'ADN extrait d'un échantillon de platane naturellement contaminé par <i>C. platani</i>, sur 10 réplicats d'ADN extrait à partir d'une culture pure cible et d'une culture pure non-cible.</p> <p>Les résultats sont présentés dans les tableaux ci-dessous :</p>

Répétabilité

	Ctmoy ± SD (n=10)	CV	résultat qualitatif
100LOD	26,745 ± 0,08	0,30	+
10LOD	30,062 ± 0,19	0,62	+
23-1459	17,133 ± 0,07	0,42	+
LSVM1480	13,136 ± 0,16	1,21	+
LSVM0889	>40	n.a.	-

Reproductibilité

	Ctmoy ± SD (n=10)	CV	résultat qualitatif
100LOD	27,46 ± 0,31	1,13	+
10LOD	30,46 ± 0,42	1,39	+
23-1459	17,00 ± 0,23	1,35	+
LSVM1480	13,17 ± 0,27	2,02	+
LSVM0889	>40	n.a.	-

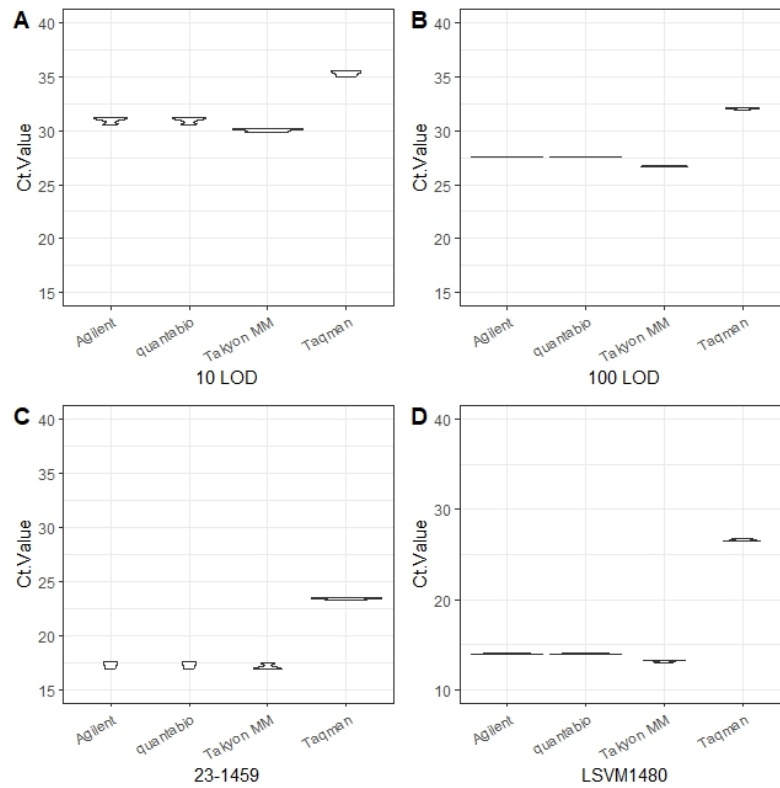
La répétabilité et la reproductibilité qualitatives sont toutes les deux à 100% et les coefficients de variation sont tous inférieurs à 10 %.

Le test est donc jugé répétable et reproductible.

Transférabilité

La transférabilité a été évaluée en utilisant 4 kits d'amplification enzymatiques différents provenant de 4 fournisseurs. Pour cela, 10 répliquats d'une solution plasmidique calibrée, dosée à 2 concentrations proches de la LOD, 10 répliquats d'ADN extrait à partir d'une culture pure cible et d'une culture pure non-cible et 10 répliquats d'un échantillon naturellement contaminé par *C. platani* ont été utilisés.

Les résultats sont représentés sur la figure ci-dessous:



La culture pure non-cible n'a généré aucune valeur de Ct.
 Les échantillons cibles ont générée des valeurs de Ct, quel que soit le kit d'amplification enzymatique utilisé.

Le test est donc jugé transférable.

Bibliographie

- Ioos, R., C. Fourrier, G. Iancu & T. R. Gordon (2009) Sensitive Detection of *Fusarium circinatum* in Pine Seed by Combining an Enrichment Procedure with a Real-Time Polymerase Chain Reaction Using Dual-Labeled Probe Chemistry. *Phytopathology*, 99, 582-590.
- Pilotti, M., Lumia, V., Di Lernia, G. & Brunetti A. (2012) Development of real-time PCR for in wood-detection of *Ceratocystis platani*, the agent of canker stain of *Platanus* spp. *European Journal of Plant pathology*, 134, 61-79.

Annexe 1 : Conseils de prélèvement des échantillons au terrain



Décaper l'écorce afin de mettre en évidence les zones symptomatiques de l'arbre.

A l'aide d'une tarière de Pressler, d'un ciseau à bois ou d'une perceuse munie d'une mèche à bois de diamètre 10 à 12 mm, percer sur environ 1 cm de profondeur dans des zones symptomatiques. Recueillir la sciure ou les carottes de bois dans un tube ou un sachet et les expédier au laboratoire d'analyses.



Annexe 2 : Conseils de prélèvement des prises d'essai au laboratoire



©Cécile Guinet, ANSES

A l'aide d'une spatule micro-cuillère prélever l'équivalent d'une cuillère bombée de sciure et la transférer dans un tube de Lysing Matrix A (MP Biomedicals).

Pour les échantillons constitués de carottes ou de copeaux de bois, prélever des fragments à hauteur d'un quart du tube de Lysing Matrix A maximum, bille céramique et paillettes comprises. Réaliser deux prises d'essai par échantillon.



©Cécile Guinet, ANSES



©Cécile Guinet, ANSES



©Cécile Guinet, ANSES



©Cécile Guinet, ANSES



©Cécile Guinet, ANSES



©Cécile Guinet, ANSES

Annexe 3

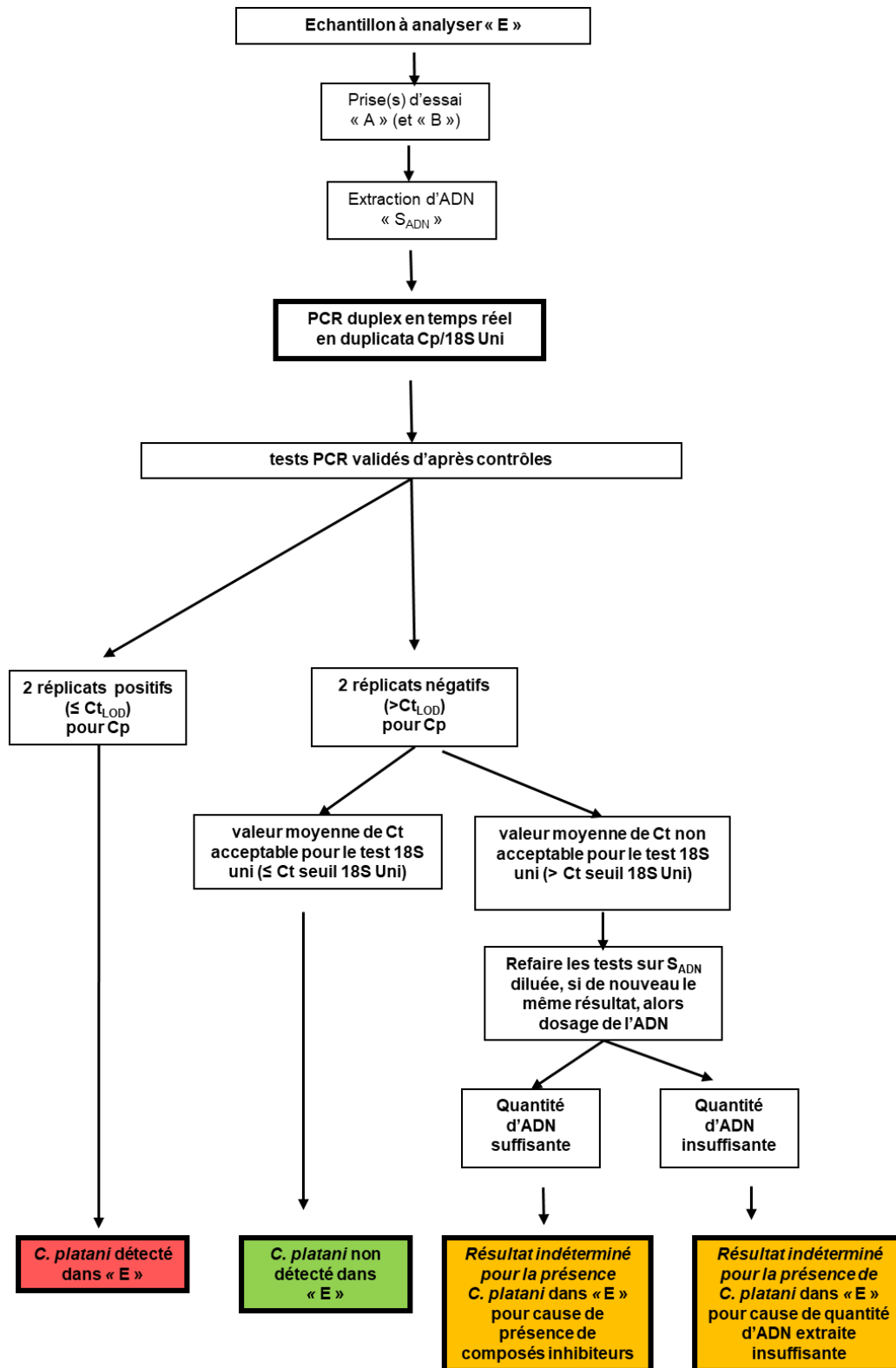


Figure 2 : Diagramme décisionnel et formulation du résultat

