

Méthode d'analyse en santé des végétaux

RÉFÉRENCE : ANSES/LSV/MA078- Version 1

Consultation

Détection de *Melampsora medusae* f. sp. *tremuloidae* 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.

Avant-propos

La présente méthode a été développée par :

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

Laboratoire National de Référence Champignons phytopathogènes sur toute matrice

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

Contact : nancy.lsv@anses.fr

La présente méthode a été mise au point par l'unité de mycologie du Laboratoire de la Santé des Végétaux, en collaboration avec l'UMR INRA/Université de Lorraine Interactions arbres microorganismes et le Canadian Forest Service (Québec, Canada).

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	8
4. Principe de la méthode	8
5. Réactifs	9
5.1 Eau.....	9
5.2 Kits d'extraction d'ADN	9
5.3 Oligonucléotides.....	9
5.4 Pré-mix de PCR en temps réel	10
5.5 Autres consommables à usage unique	10
5.6 Contrôles et témoins.....	10
6. Appareillage et matériels	12
7. Échantillons	13
7.1 Conditions d'acceptation des échantillons	13
7.2 Conservation des échantillons avant analyse	13
7.3 Conservation des reliquats d'échantillons utilisés :	14
8. Mode opératoire	14
8.1 Préparation des échantillons pour analyse	14
8.2 Broyage des prises d'essai et extraction de l'ADN total	15
8.3 Test de détection par PCR en temps réel	16
9. Résultats	17
9.1 Contrôle de la validité des résultats	17
9.2 Calculs et expression des résultats	18
10. Caractéristiques de performance de la méthode	19
Bibliographie	23
Annexe 1	24

Introduction

Melampsora medusae Thümen est un des agents responsables de la rouille du peuplier. Cette espèce produit des lésions sporulantes (urédies) à la surface des feuilles provoquant une défoliation précoce et une réduction de la vitesse de croissance des peupliers, pouvant entraîner la mort dans des cas d'infections sévères. *Melampsora medusae* est originaire d'Amérique du nord et s'est dispersé sur d'autres continents (Frey *et al.* 2005; EPPO 2009). En Europe, sa présence n'a été rapportée que ponctuellement et dans des zones restreintes, en France, Belgique et Portugal (Frey *et al.* 2005; EPPO 2009).

Deux formes spéciales ont été décrites, morphologiquement indistinctes : *M. medusae* f. sp. *deltoidae* uniquement pathogène sur les espèces de peupliers de la section *Aigeiros*, incluant les peupliers cultivés tels *P. deltoides* and *P. x euramericana*, et *M. medusae* f. sp. *tremuloidae* jusqu'à présent uniquement pathogène sur le peuplier sauvage faux-tremble *P. tremuloides* (Shain, 1988).

L'objet de cette méthode est de détecter *Melampsora medusae* f. sp. *tremuloidae* à partir d'urédies issues des tissus foliaires de *Populus* sp. La présence de *Melampsora medusae* f. sp. *tremuloidae* est mise en évidence par la technique de PCR en temps réel.

Avertissements et précautions de sécurité

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

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

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

Élimination des matériels susceptibles d'être contaminants :

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

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

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

1. Objet et domaine d'application

L'objet de cette méthode est de détecter la présence de *M. medusae* f. sp. *tremuloidae* (*Mmt*), à partir d'un échantillon d'urédospores récoltées sur des feuilles de peuplier présentant des symptômes de rouille au stade urédien. La présence de *Mmt* est mise en évidence par un test de détection par PCR (Polymerase Chain Reaction) en temps réel utilisant une combinaison d'amorces et de sonde d'hydrolyse.

Cette méthode est qualitative, elle permet de détecter *Mmt* dans la limite du seuil de détection de la technique employée mais pas de le quantifier dans l'échantillon analysé. Les échantillons pour lesquels une réponse négative est obtenue sont considérés comme indemnes de *Mmt* ou contaminé à un niveau trop faible pour être mis en évidence par la technique utilisée. Les échantillons pour lesquels une réponse positive est obtenue sont considérés comme contaminés par *Mmt*.

La méthode s'applique sur des échantillons d'urédospores de *Melampsora spp.* récoltées dans des microtubes stériles de 2 mL. Un échantillon individuel d'urédospores dans un microtube sera utilisé intégralement pour l'analyse et représentera la prise d'essai.

Objets susceptibles d'être soumis à analyse :

Cette méthode a été validée sur des spores de *Mmt* issues de peupliers faux-tremble infectés (voir dossier de validation du LNR – LSV Unité de mycologie document MIAM024).

Type de prélèvement :

Le prélèvement d'urédies pour analyse doit être réalisé à l'aide d'une spatule ou d'un scalpel en raclant la surface de la feuille infectée. Les urédies sont collectées dans un microtube de 1,5 mL ou de 2 mL de type Eppendorf SafeLock. 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.

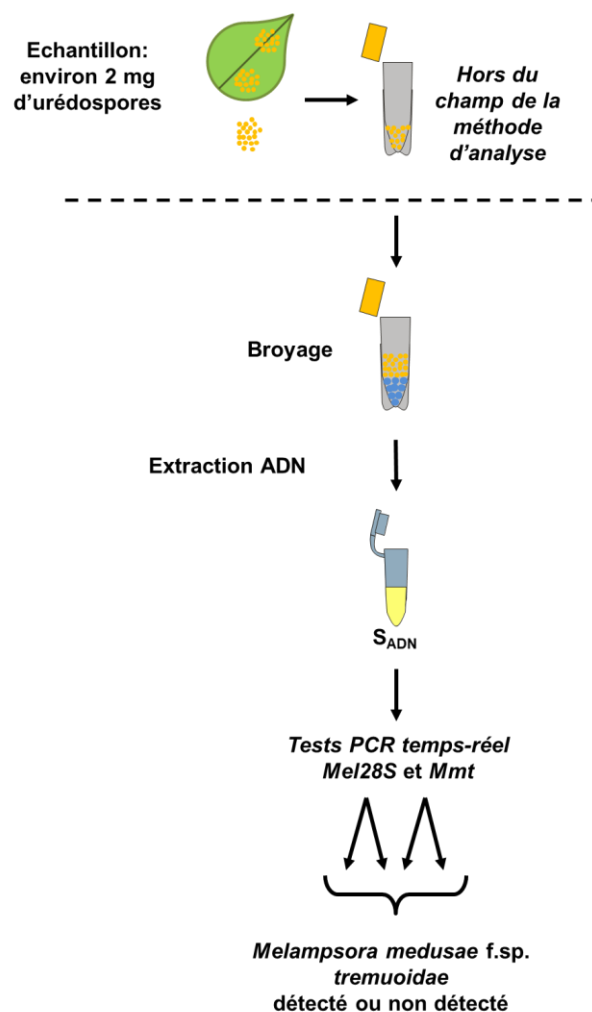
3. Termes, sigles et définitions

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..

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 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 validé pour cette méthode est le Dneasy Plant mini kit (Qiagen).

5.3 Oligonucléotides

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

Test	Amorces et sonde	Séquence (5'-3')
Mmt ¹	Mmt-F Mmt-R Mmt-P	
Mel28S ²	Mel28S-F Mel28S-R Mel28S-P	TGATACGGTTTCTAAGAGTCGAG CATCTTCCCTCACGGTACTTG JOE-TTGGGAATGCAGCTCAAAGTGGG- BHQ[®]1

¹Guinet et al, soumis à publication

²Boutigny et al, 2013

Les amorces et sondes initialement validées pour cette méthode ont été synthétisées par Eurogentec. 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)
- Takyon No Rox Probe Core Kit 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 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, et la concentration 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 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 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 répliquats 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 (T_{+ Mel28S})** sera systématiquement testé en deux répliquats lors de chaque réaction de PCR en temps réel Mel28S. Il permet de vérifier que la réaction PCR Mel28S s'est effectuée de façon correcte. Ce T₊ est constitué d'une solution calibrée d'ADN génomique dosée à 1 ng/μL obtenue à partir d'un échantillon de spores de *Melampsora* spp..
- **Un témoin positif d'amplification en limite pratique de détection (T_{+LOD})** sera systématiquement testé en deux répliquats lors de chaque réaction de PCR en temps réel Mmt. 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 *Mmt* puisse avoir été détectée dans un échantillon par ce protocole. Ce T_{+LOD} est constitué d'une solution calibrée de plasmides bactériens dans lesquels est insérée la cible du test PCR Mmt. 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 63,6 copies plasmidiques de cible pour le test Mmt par tube de PCR.

- **Un témoin négatif d'amplification (T₋ ou NTC, no template control)** sera systématiquement introduit en deux répliquats 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).
- **Un contrôle de la qualité de l'extraction d'ADN et de la présence d'inhibiteurs sera réalisé pour chaque prise d'essai pour lesquelles le test Mmt a généré un résultat négatif.** Il prendra la forme d'un test PCR temps réel utilisant la combinaison d'amorces / sonde Mel28S-F/-R/-P (Boutigny et al, 2013). Ce test sera réalisé en monoplex. Une solution d'ADN (S_{ADN}) sera dite positive pour le test Mel28S 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 spores de *Melampsora* spp. la valeur maximale acceptable de Ct moyen pour le test Mel28S Uni a été déterminée à 26,2.

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).

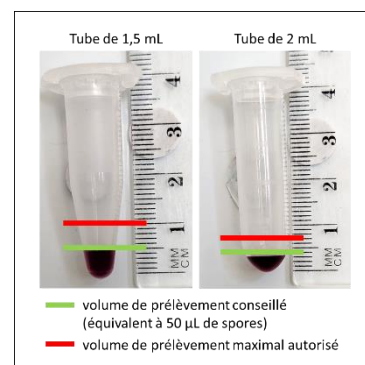
7. Échantillons

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 pour analyse devraient idéalement être constitués d'environ 2 mg d'urédospores, soit environ un volume de 50 μ L. L'analyse pourra toutefois être réalisée sur une quantité de prélèvement moindre si peu de matériel biologique est disponible sur le terrain. En revanche, la quantité de prélèvement ne doit pas dépasser le haut de la partie arrondie du fond d'un microtube de 2 mL ou la moitié de la partie cônique du fond d'un tube de 1,5 mL (voir image), car le broyage ne pourrait alors s'effectuer correctement.



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.

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

Les prises d'essai en microtubes peuvent être conservées congelées jusqu'à 6 mois avant analyse.

7.3 Conservation des reliquats d'échantillons utilisés :

L'analyse est réalisée sur la totalité de l'échantillon reçu au laboratoire. Il n'y a donc pas de reliquat d'échantillon pour analyse pour cette méthode d'analyse. L'extrait d'ADN obtenu à partir de l'échantillon pour analyse doit être conservé pendant au minimum une année.

8. Mode opératoire

8.1 Préparation des échantillons pour analyse

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.

Un échantillon correspond à un regroupement de plusieurs prélèvements ponctuels effectués à partir de grattage d'urédies sur une ou plusieurs feuilles bien infectées de manière à obtenir une quantité suffisante équivalent à environ 2 mg d'urédospores au fond du microtube de 2 mL stérile (soit environ 50µL de poudre d'urédospores au fond du tube correspondant à une hauteur de 4 et 5 mm pour respectivement un tube de 2 et 1,5 mL).

La fermeture hermétique du microtube sera vérifiée. Les microtubes seront individuellement identifiés à l'aide d'un marqueur permanent et leur référence sera reportée sur une fiche de prélèvement. Les échantillons peuvent être conservés au congélateur avant envoi. L'envoi devra s'effectuer par transport rapide à destination du laboratoire d'analyse.

L'exigence de confinement pour la manipulation de formes viables de cet agent pathogène à dissémination par voie solide ou liquide doit être de type NS3, dans la mesure où le laboratoire d'analyse est situé en zone indemne. A défaut, un recueil et une destruction des déchets solides et liquide sera suffisante pour prévenir toute dissémination de l'organisme cible.

Les échantillons reçus non correctement conditionnés (trop remplis, mal codifiés, non hermétiquement fermés, brisés, ...) seront autoclavés pour des raisons de précaution phytosanitaire.

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

Les tubes hermétiquement fermés seront obligatoirement plongés et agités pendant 30 secondes dans une solution désinfectante d'eau de javel à 0.5% puis séchés avec du papier absorbant. Cette phase permet d'éliminer toute trace de contamination externe du tube par *M. medusae* qui pourrait se produire lors de la mise en tube.

Chaque échantillon est traité individuellement. Les premières étapes d'analyses des 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.

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. Centrifuger quelques secondes le microtube contenant la prise d'essai jusqu'à atteindre la vitesse de 7000 g afin de concentrer les spores au fond du tube. Ouvrir le microtube et y ajouter le volume de tampon de lyse préconisé par le fabricant de kit d'extraction d'ADN.
3. Remettre délicatement les spores en suspension par aspiration / refoulement à l'aide de la micropipette munie d'un cône à filtre dont le bout aura été coupé, puis transférer l'intégralité des spores et du tampon de lyse dans un tube de Lysing Matrix C (MP Biomedicals) ou dans un tube stérile 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). 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. Le volume à ajouter est celui préconisé par le fabricant (fournie avec le kit d'extraction).
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 (environ 20.000 g). 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'élué. Ces solutions constitueront la solution (extrait) d'ADN directement analysée par PCR en temps réel (S_{ADN}).

Après extraction d'ADN, les extraits sont conservés par congélation (<-18°C) au minimum pendant une année.

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 monoplex Mmt :**

Tableau 2 : composition du mélange réactionnel Mmt

Composé	Concentration finale
Eau Ultra Pure	qsp 18 μL
Takyon No Rox Probe MasterMix blue dTTP	0.5x
Amorce sens Mmt-F	0.3 μM
Amorce antisens Mmt-R	0.3 μM
Sonde Mmt-P	0.1 μM

- **PCR temps réel monoplex Mel28S :**

Tableau 3 : composition du mélange réactionnel Mel28S

Composé	Concentration finale
Eau Ultra Pure	qsp 18 μL
Takyon No Rox Probe MasterMix blue dTTP	0.5x
Amorce sens Mel28S-F	0.3 μM
Amorce antisens Mel28S-R	0.3 μM
Sonde Mel28S-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_{-extr} , T_{+LOD} , etc. Pour le T- (NTC), on substitue à la S_{ADN} 2 μ L 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 *Mmt* 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	5 min	1
2	Dénaturation	95°C	15 sec	40
3	Hybridation - polymérisation	66°C	45 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 et générées par l'appareil de PCR en temps réel 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_{+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 *Mmt*.

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

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

Tableau 6 : PCR monoplex *Mmt* réalisée sur S_{ADN}

Test <i>Mmt</i>		Décision et résultat
Puits 1	Puits 2	
+	+	Arrêt de l'analyse : <i>Mmt</i> détecté
-	-	Réaliser la PCR Mel28S et suivre le tableau 7 pour les règles décisionnelles
+	-	Refaire la PCR <i>Mmt</i> , si de nouveau un seul puits sur les deux génère une valeur positive, entreprendre des analyses complémentaires ¹

Tableau 7 : PCR monoplex Mel28S réalisée sur S_{ADN}

Test Mel28S		Décision et résultat
Puits 1	Puits 2	
+ ²	+ ²	Arrêt de l'analyse : <i>Mmt</i> non détecté au seuil de détection de la méthode
_ ³	_ ³	Refaire la PCR monoplex <i>Mmt</i> sur S_{ADN} diluée 10 fois et suivre le tableau 8 pour les règles décisionnelles
+	-	Refaire la PCR <i>Mmt</i> , si de nouveau un seul puits sur les deux génère une valeur positive, entreprendre des analyses complémentaires ¹

¹ 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.

² Valeur moyenne de Ct Mel28S échantillon inférieure ou égale au Ct_{seuil} Mel28S déterminé au laboratoire

³ Valeur moyenne de Ct Mel28S échantillon supérieure au Ct_{seuil} Mel28S déterminé au laboratoire

Tableau 8 : PCR monoplex Mmt réalisée sur S_{ADN} diluée au 1/10e

Test Mmt		Décision et résultat
Puits 1	Puits 2	
+	+	Arrêt de l'analyse : Mmt détecté
-	-	Réaliser la PCR Mel28S sur S _{ADN} diluée 10 fois et suivre le tableau 9 pour les règles décisionnelles
+	-	Refaire la PCR monoplex Mmt, si de nouveau un seul puits sur les deux génère une valeur positive, entreprendre des analyses complémentaires ¹

Tableau 9 : PCR monoplex Mel28S réalisée sur S_{ADN} diluée au 1/10e

Test Mel28S		Décision et résultat
Puits 1	Puits 2	
+ ²	+ ²	Mmt non détecté au seuil de détection de la méthode
- ³	- ³	Arrêt de l'analyse : résultat indéterminé⁴
+	-	Refaire la PCR monoplex Mel28S, si de nouveau un seul puits sur les deux génère une valeur positive, entreprendre des analyses complémentaires ¹

Le diagramme décisionnel simplifié (ne prenant pas en compte les règles à suivre en cas d'amplification pour un seul puits du réplicat) et résumant ces conditions est présenté en annexe 1.

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 024.

¹ 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.

² Valeur moyenne de Ct Mel28S échantillon inférieure ou égale au Ct_{seuil} Mel28S déterminé au laboratoire

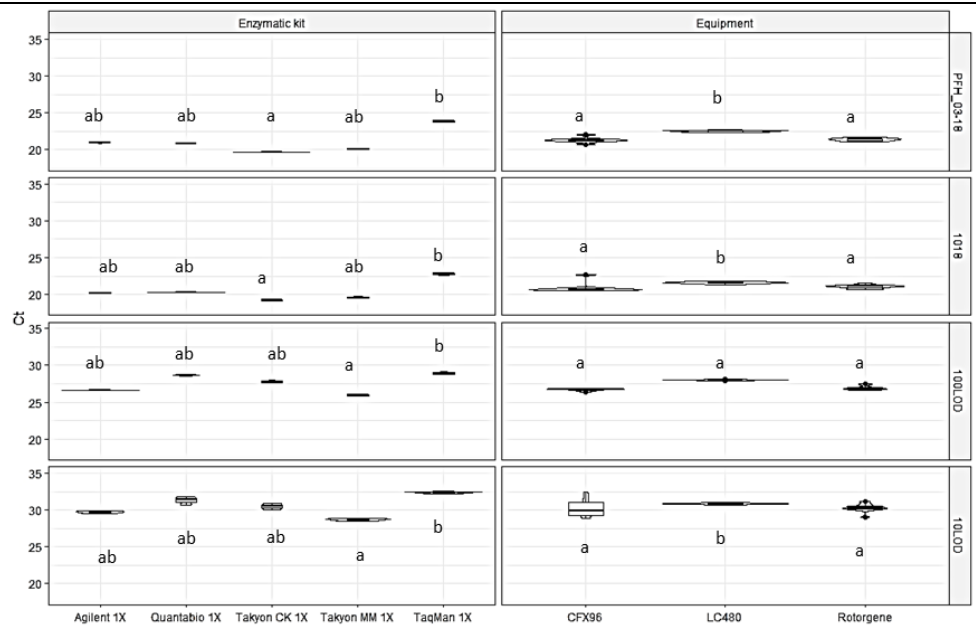
³ Valeur moyenne de Ct Mel28S échantillon supérieure au Ct_{seuil} Mel28S déterminé au laboratoire

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

Tableau 10 : 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 Mmt sur une gamme de solutions plasmidiques calibrées diluées dans du TE (1X) a été évaluée à 106% avec un $R^2=0,9996$
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 Mmt, la sensibilité a été estimée à 63,2 copies plasmidiques (cp) par tube de PCR.
Spécificité analytique	La spécificité analytique du test a été évaluée <i>in vitro</i> sur 90 isolats de <i>Melampsora spp.</i> , dont 30 correspondant à des isolats de <i>Melampsora medusae</i> f. sp. <i>deltoidae</i> . Le test est 100% spécifique.
Inclusivité	L'inclusivité du test PCR en temps réel a été démontrée <i>in vitro</i> sur 41 isolats de <i>Mmt</i> de différentes provenances géographiques. Le test est 100% inclusif.
Répétabilité et reproductibilité	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 de deux échantillons naturellement contaminés par <i>Mmt</i> (1018 et PFH 03-18), et d'un échantillon non contaminé par <i>Mmt</i> (99A4). Les résultats pour les échantillons positifs sont présentés dans la figure ci-dessous (les valeurs correspondent au coefficient de variation) :

	<p>L'échantillon négatif (99A4) n'a généré aucune valeur de Ct, que ce soit pour la répétabilité ou la reproductibilité.</p> <p>La répétabilité et la reproductibilité qualitatives sont toutes les deux à 100% et les coefficients de variation sont tous inférieurs à 10 %.</p> <p>Le test est donc jugé répétable et reproductible.</p>
<p>Transférabilité</p>	<p>La transférabilité a été évaluée en utilisant 5 kits d'amplification enzymatiques provenant de 4 fournisseurs différents ($n=3$), et 3 plateformes PCR différentes ($n=10$). Pour cela, une solution plasmidique calibrée, dosée à 2 concentrations proches de la LOD, et une solution d'ADN génomique extrait à partir de deux échantillons naturellement contaminés et d'un échantillon naturellement non contaminé par <i>Mmt</i> ont été utilisés.</p> <p>Les résultats sont représentés sur la figure ci-dessous:</p>



Les analyses statistiques ont été réalisées indépendamment entre les kits enzymatiques testés et les équipements PCR utilisés. Les paramètres avec les mêmes lettres ne présentent pas de différence statistique selon les tests de Kruskal-Wallis et Dunn ($p < 0,05$).

L'échantillon naturellement non contaminé n'a généré aucune valeur de Ct, quel que soit le kit enzymatique ou la plateforme PCR utilisé.

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

- [1] Boutigny AL, Guinet C, Vialle A, Hamelin R, Andrieux A, Frey P, Husson C, Ioos R, 2013. Optimization of a real-time PCR assay for the detection of the quarantine pathogen *Melampsora medusae* f. sp. *deltoidae*. *Fungal Biology* 117(6): 389-398.
- [2] EPPO, 2009. PM 7/93 (1): *Melampsora medusae*. *EPPO Bulletin* 39: 328-336.
- [3] Frey P, Gérard P, Feau N, Husson C, Pinon J, 2005. Variability and population biology of *Melampsora* rusts on poplars. In: Rust diseases of Willow and Poplar. Ed. by Pei M. H.; McCracken A. R. Wallingford: CAB International, pp. 63-72.
- [4] Guinet C, Buronfosse M, Tanguay P, Frey P, Ioos R. Development of a new tool to detect *Melampsora medusae* f. sp. *tremuloidae* causing rust disease on *Populus tremuloides*. *Submitted*.
- [5] Shain L, 1988. Evidence for formae speciales in the poplar leaf rust fungus, *Melampsora medusae*. *Mycologia* 80: 729-732.

Annexe 1

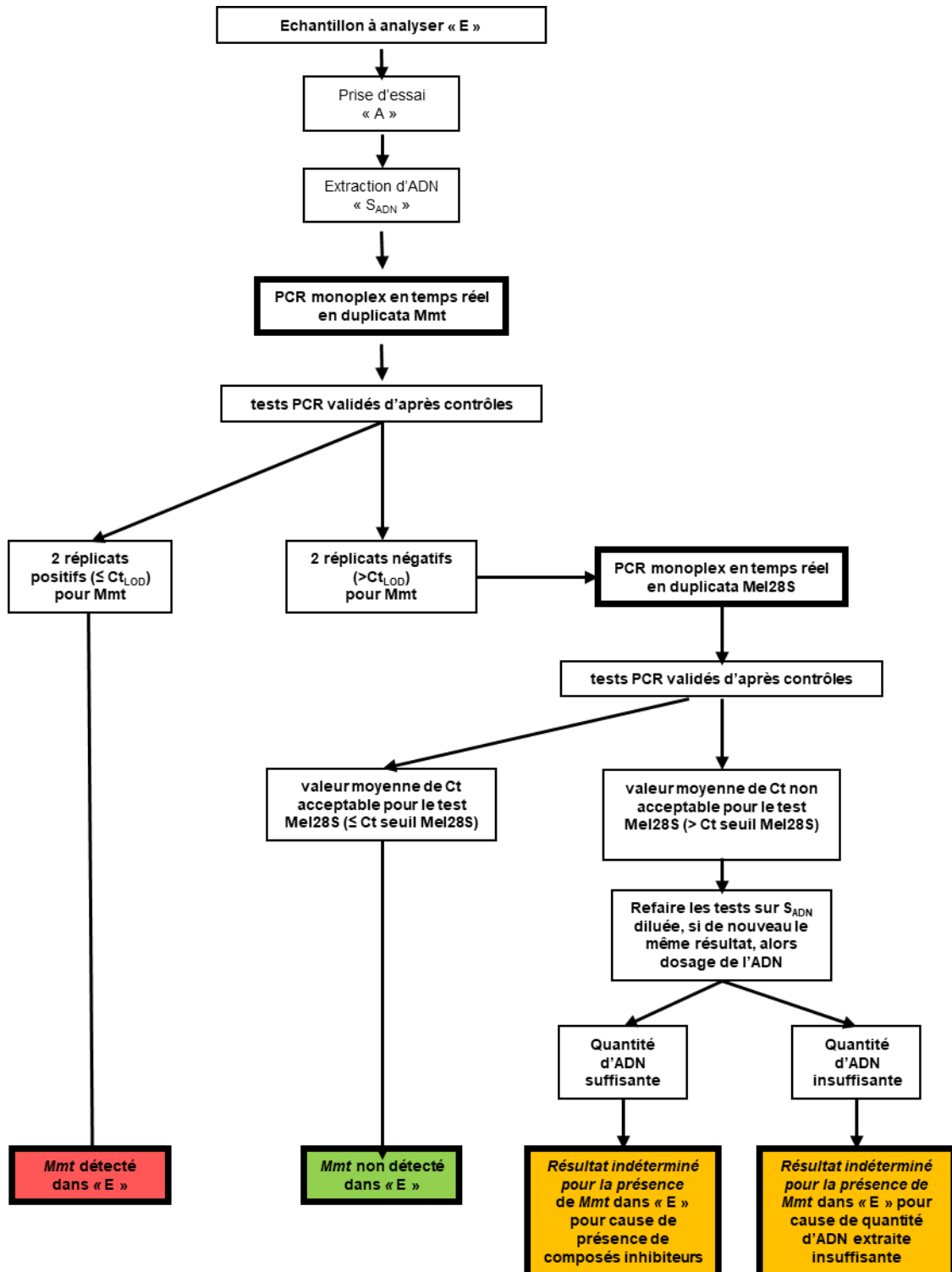


Figure 2 : Diagramme décisionnel et formulation du résultat