Ordre de méthode

Liberté • Égalité • Fraternité
RÉPUBLIQUE FRANÇAISE

MINISTÈRE
DE L'AGRICULTURE
DE L'AGROALIMENTAIRE
ET DE LA FORÊT

Direction générale de l'alimentation **Service des actions sanitaires en production primaire** **Sous-direction de la qualité et de la protection des végétaux** **Bureau des semences et de la santé des végétaux** **251 rue de Vaugirard** **75 732 PARIS CEDEX 15** **0149554955**	**Note de service** **DGAL/SDQPV/2015-528** **15/06/2015**

Date de mise en application : 04/06/2015
Diffusion : Tout public

Date limite de mise en œuvre : 04/06/2015
Cette instruction n'abroge aucune instruction.
Cette instruction ne modifie aucune instruction.
Nombre d'annexes : 1

Objet : Méthode officielle d'analyse MOA 036 version 1a relative à la détection des souches sur Musa spp. responsables de la Maladie de la Moko et des variants IIB-4NPB dans le complexe d'espèces Ralstonia solanacearum par duplex-PCR conventionnelle.

Destinataires d'exécution
DRAAF DAAF ANSES - LSV Laboratoires agréés

Résumé : Publication de la méthode officielle d'analyse MOA 036 version 1a relative à la détection des souches sur Musa spp. responsables de la Maladie de la Moko et des variants IIB-4NPB dans le complexe d'espèces Ralstonia solanacearum par duplex-PCR conventionnelle.

Textes de référence : Article R 202 du code rural, décret 2006-7 du 4 Janvier 2006 relatif aux laboratoires nationaux de référence, ainsi qu'à l'agrément et à la reconnaissance des laboratoires d'analyses dans le domaine de la santé publique vétérinaire et de la protection des végétaux, et modifiant le code rural, arrêté ministériel du 19 décembre 2007 fixant les conditions générales

d'agrément des laboratoires d'analyses dans le domaine de la santé publique vétérinaire et de la protection des végétaux

Les souches *Ralstonia solanacearum* provoquant la maladie de Moko et les variants IIB-4NPB sont listées comme organismes de quarantaine dans la directive 2000/29/CE du 8 mai 2000.

La présente note a pour objet la publication officielle d'une nouvelle méthode de détection de *R. solanacearum* provoquant la maladie de Moko et les souches variantes IIB-4NPB, basée sur une duplex-PCR conventionnelle. Celle-ci permet de détecter spécifiquement les souches Moko et les souches variantes IIB-4NPB, épidémiologiquement active sur les continents d'Amérique du Sud et asiatique, dont les hôtes végétaux appartiennent à la famille des *Musaceae* et *Solanaceae*.

Cette méthode est disponible sur le site de l'Anses (www.anses.fr) et doit être utilisée aussi bien pour les analyses officielles dans le cadre des contrôles phytosanitaires en surveillance du territoire, que pour les analyses de confirmation demandées au LNR.

Je vous saurais gré de bien vouloir me faire connaître les éventuelles difficultés rencontrées dans la mise en œuvre de ces instructions.

Le Directeur général de l'alimentation

Patrick DEHAUMONT

DETECTION DES SOUCHES SUR *MUSA SPP.* RESPONSABLES DE LA MALADIE DE LA MOKO ET DES VARIANTS IIB-4NPB DANS LE COMPLEXE D'ESPECES *RALSTONIA SOLANACEARUM*

METHODE OFFICIELLE D'ANALYSE

Réf. : MOA 036 version 1a

Droits de reproduction et Copyright

Le présent document est, sous sa forme électronique, mis gratuitement à la disposition des usagers du ministère chargé de l'agriculture en tant que méthode.

Le présent document est la propriété du ministère chargé de l'Agriculture, toute reproduction qu'elle soit totale ou partielle ne peut être effectuée qu'à la condition expresse que la source soit citée.

Dates de validité du présent document

Le présent document a valeur de méthode officielle à compter de sa date de publication indiquée ci-après. Il remplace alors *de facto* toute version antérieure.

Cependant, et sauf indication contraire explicite, la version précédente peut encore être utilisée pendant une durée maximale de 18 mois à compter de la date de publication de la nouvelle version, afin de tenir compte des cycles d'accréditation auxquels sont soumis les laboratoires de référence, agréés et reconnus officiellement.

Ce document étant susceptible d'évolution, il est de la responsabilité exclusive des utilisateurs de vérifier régulièrement qu'ils disposent bien de la dernière version.

Le tableau ci-dessous récapitule l'historique des versions de la méthode.

MOA 036	**Consultation publique**		**Validité**	
Numéro de la version	**Début**	**Fin**	**Début**	**Fin**
MOA 036 version 1consultation	08 décembre 2014	21 décembre 2014	Sans objet	Sans objet
MOA036 version1a	x	x	Janvier 2015	

SOMMAIRE

SOMMAIRE 3
Table des illustrations 5
PRÉAMBULE 6
Objet des méthodes officielles 6
Glossaire, abréviations et documents connexes 6
Limites imposées aux laboratoires agréés ou reconnus 6
Échantillonnage et Échantillon 6
Modification des méthodes officielles 7
Considérations d'ordre métrologique 7
Obligations réglementaires et limites de responsabilité 8
Revue des méthodes officielles, amendement et modification 8
ORIGINE DE LA METHODE 9
PRINCIPALES MODIFICATIONS PAR RAPPORT A LA VERSION PRECEDENTE 10
Modifications 10
Améliorations 10
DESCRIPTION DE LA METHODE 11
1. Introduction 11
2. Objet 12
3. Domaine d'application 12
4. Présentation schématique de la détection 13
5. Produits et consommables 15
5.1. Milieux et solutions 15
5.1.1. Réactifs de biologie moléculaire 16
5.1.2. Tampons 16
5.2. Oligonucléotides 16
5.3. Autres consommables 17
6. Appareillage et matériel 17
7. Contrôles et témoins 18
8. Etapes de l'analyse 19
8.1. Prise d'analyse 19
8.2. Broyage des pseudo-troncs 19
8.3. Isolement sur boite de Pétri gélosée 19

8.4. Amplification PCR spécifique des souches Moko et variantes IIB-4NPB sur broyat végétal 21
8.4.1. Mélange réactionnel ... 21
8.4.2. Dépôt des ADN ... 21
8.4.3. Cycles thermiques PCR ... 22

8.5. Amplification PCR générale pour *Ralstonia solanacearum* ... 22
8.5.1. Préparation du mélange réactionnel ... 22
8.5.2. Dépôt des ADN ... 22
8.5.3. Cycles thermiques PCR ... 23

8.6. Amplification PCR spécifique des souches Moko et variantes IIB-4NPB ... 23
8.6.1. Mélange réactionnel ... 23
8.6.2. Dépôt des ADN ... 23
8.6.3. Cycles thermiques PCR ... 24

8.7. Électrophorèse et révélation ... 24

8.8. Résultats ... 25
8.8.1. Analyse et interprétation des résultats du screening de détection ... 25
8.8.2. Analyse et interprétation de détection générale ... 26
8.8.3. Analyse et interprétation des résultats dans le cas d'une analyse de résultat PCR : ... 26
8.8.4. Formulation des résultats de biologie moléculaire ... 27

9. Analyses de confirmation ... 28

10. Élimination des matériels susceptibles d'être contaminants ... 28

11. Conservation des reliquats de matériels utilisés ... 29

REMERCIEMENTS ... 30

LISTE DES DOCUMENTS OFFICIELS APPELES PAR LA METHODE ... 30

ANNEXE 1 – Composition du tampon de broyage TRIS ... 31

ANNEXE 2 - Recette du milieu gélosé de Kelman ... 32

ANNEXE 3 - Recette du milieu gélosé de Sequeira modifié ... 33

ANNEXE 4 - Recette du milieu gélosé SMSA (Englebrecht, 1994, modifiée par Elphinstone et coll., 1996) ... 34

BIBLIOGRAPHIE SUCCINCTE ... 35

TABLE DES ILLUSTRATIONS

Figure 1 - Schéma de détection de Ralstonia solanacearum, des souches Moko et variantes IIB-4NPB 13

Photo 1 - Colonies typiques de Ralstonia solanacearum sur milieu gélosé de Sequeira modifié 20

Tableau 1 - Mix réactionnel pour la PCR 93F/93R de détection des souches Moko et variantes IIB-4NPB..... 21

Tableau 2 - Cycle PCR 93F/93R pour la détection des souches Moko et variants IIB-4NPB 22

Tableau 3 - Mix réactionnel pour la PCR OLI1/Y2 de détection des souches de Ralstonia solanacearum 22

Tableau 4 - Cycle PCR OLI1/Y2 pour la détection des souches du complexe d'espèces Ralstonia solanacearum . 23

Tableau 5 - Mix réactionnel pour la PCR 93F/93R de détection des souches Moko et variants IIB-4NPB 23

Tableau 6 - Cycle PCR 93F/93R pour la détection des souches Moko et variants IIB-4NPB 24

Tableau 7 - Matrice de décision pour le screening de Ralstonia solanacearum..... 25

Tableau 8 - Matrice de décision pour la détection générale de Ralstonia solanacearum..... 26

Tableau 9 - Matrice de décision pour l'interprétation des résultats des contrôles PCR 26

Tableau 10 - Matrice de décision pour l'interprétation des résultats d'analyse 27

Tableau 11 - Formulation des résultats d'amplification PCR 27

PRÉAMBULE

OBJET DES METHODES OFFICIELLES

Les méthodes officielles, au sens du décret 2006-7 du 4 Janvier 2006, sont les méthodes validées par le ministère chargé de l'agriculture pour l'utilisation dans le cadre des actes officiels relevant de ses services (plans de contrôle et de surveillance, contrôles à l'importation et à l'exportation…). Ces méthodes concernent le diagnostic, la détection ou l'identification d'organismes nuisibles aux cultures, d'organismes envahissants ou d'organismes génétiquement modifiés pour le domaine d'application précisé dans la méthode.

Ces méthodes servent de « méthodes publiées » au sens de la norme ISO 17025 pour l'accréditation des laboratoires par le COFRAC.

GLOSSAIRE, ABREVIATIONS ET DOCUMENTS CONNEXES

Afin de limiter les problèmes d'interprétation des termes employés, le vocabulaire utilisé dans les méthodes officielles du ministère chargé de l'agriculture 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 des méthodes officielles.

Certains documents (composition de milieux et tampons…) peuvent être communs à plusieurs méthodes officielles. Pour faciliter leur harmonisation et leur mise à jour, ils sont rassemblés dans des recueils spécifiques, considérés comme faisant partie intégrante des méthodes officielles. Les méthodes officielles appellent alors ces documents spécifiques en donnant leur code tel que repris dans les recueils.

LIMITES IMPOSEES AUX LABORATOIRES AGREES OU RECONNUS

Le ministère chargé de l'agriculture peut proposer ou imposer aux laboratoires, agréés ou reconnus, de stopper l'analyse à une certaine étape précisée dans la méthode officielle et, le cas échéant, de transmettre le matériel nécessaire à la poursuite de l'analyse dans un autre laboratoire, agréé ou de référence. Il est de la responsabilité de chaque laboratoire de veiller à suivre les contraintes définies par son périmètre d'agrément ou de reconnaissance et par les exigences du ministère.

ÉCHANTILLONNAGE ET ÉCHANTILLON

L'échantillonnage, est de la responsabilité des préleveurs et ses modalités sont définies par ailleurs.

L'échantillon reçu est réputé être homogène en l'état de sa réception, par contre, il n'est pas forcément représentatif du lot d'où il provient et le laboratoire ne pourra en aucune façon attester du caractère représentatif au sens de la statistique.

Le laboratoire peut être amené à séparer l'échantillon reçu en sous-échantillons pour les besoins de l'analyse, il s'agit alors d'une simple division et non d'un réel sous-échantillonnage au sens de la statistique, et le laboratoire n'a pas de ce fait à être accrédité pour l'échantillonnage.

MODIFICATION DES METHODES OFFICIELLES

Sur le principe, seules les méthodes officielles peuvent être utilisées dans le cas d'analyses officielles, sans aucune modification. Néanmoins, et afin que les laboratoires puissent mieux utiliser leurs ressources et valoriser leur expérience, la possibilité leur est laissée d'utiliser des méthodes dérivées ou alternatives, ou de remplacer un réactif-clé à la condition expresse que le LNR ait validé la modification.

Une méthode dérivée résulte de modifications de portées limitées appliquées à la méthode officielle (par exemple, remplacement d'une procédure d'extraction de l'ADN par une autre, utilisation d'un appareil de préparation de l'échantillon différent de celui prévu dans la méthode officielle…).

Une méthode alternative s'appuie sur des principes ou des technologies différentes de celles décrites dans les méthodes officielles, il s'agit réellement d'une autre méthode.

Un réactif-clé est un réactif directement impliqué dans la reconnaissance des organismes recherchés.

Les laboratoires agréés évaluent les conséquences de la modification (d'une méthode par une autre ou d'un réactif-clé par un autre) conformément aux prescriptions du LNR et transmettent le dossier d'évaluation correspondant au LNR pour validation de cette modification.

Toutes autres modifications (qui n'a pas d'incidence prévisible sur le résultat) doivent néanmoins faire l'objet d'une documentation apportant la preuve qu'elle n'interfère effectivement pas avec le résultat. Cette documentation est tenue en permanence à disposition du LNR.

Le ministère chargé de l'agriculture peut souhaiter faire profiter l'ensemble des laboratoires réalisant des analyses officielles des avantages que peuvent représenter les méthodes dérivées et alternatives qui lui sont proposées, en intégrant certaines modifications à l'occasion d'une révision de la méthode officielle. Le laboratoire à l'origine de l'amélioration est, dans ce cas, cité dans la méthode officielle.

CONSIDERATIONS D'ORDRE METROLOGIQUE

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

Volume	**volume < à 10 mL** : EMT = ± 10% **Volume ≥ à 10 mL** : EMT = ± 5 %
Masse	EMT = 10%
pH	EMT = 0,3
Température	**incubateur** : EMT = ± 3°C **réfrigérateur** : 5°C et EMT = ± 4°C **congélateur** : ≤ -18°C **congélateur froid intense** : ≤ -65°C
Longueur	EMT = 10%
Temps	EMT = 10%

OBLIGATIONS REGLEMENTAIRES ET LIMITES DE RESPONSABILITE

La mise en œuvre des méthodes officielles s'applique sans préjudice des réglementations françaises et communautaires ou des exigences normatives auxquelles doivent se soumettre les laboratoires (circulation, détention, manipulation des organismes nuisibles, détention des substances réglementées, bonnes pratiques de laboratoire, santé et sécurité au travail, mesures de confinement, agrément des laboratoires, déclaration à la commission de génie génétique …).

Dans un certain nombre de cas, les méthodes peuvent appeler l'attention des lecteurs sur des risques potentiels liés par exemple à la dangerosité de certains produits ou à la rupture du confinement. Ces mises en garde ne sont destinées qu'à aider les lecteurs et n'ont vocation ni à être exhaustives, ni à se substituer aux exigences réglementaires existantes.

Toute personne physique ou morale constatant la présence, sur un végétal, une partie de végétal ou un produit d'origine végétale, d'un organisme nuisible réglementé a l'obligation d'en faire déclaration auprès des services régionaux de l'alimentation des directions régionales de l'agriculture, de l'alimentation et de la forêt.

Les conditions de mise en œuvre des méthodes officielles ainsi que la qualité des réactifs-clés utilisés sont susceptibles de modifier la qualité des résultats obtenus avec les méthodes officielles. Ces deux derniers aspects relèvent de la responsabilité des laboratoires utilisateurs.

Le ministère chargé de l'agriculture ne saurait être tenu pour responsable dans le cas de mises en œuvre inadéquates, volontaires ou non des méthodes officielles.

REVUE DES METHODES OFFICIELLES, AMENDEMENT ET MODIFICATION

Une consultation publique est organisée en tant que de besoin avant la publication des méthodes officielles. Le document de travail est mis à disposition sur le site du ministère en charge de l'agriculture pendant une période de deux mois, au cours de laquelle les visiteurs sont invités à faire connaître leurs remarques, commentaires et suggestion et à signaler toute erreur, omission ou imprécision.

Les méthodes officielles sont par ailleurs revues périodiquement à l'initiative du ministère chargé de l'agriculture ou du laboratoire national de référence. A chaque modification, le code de la méthode change comme indiqué au chapitre « principales modifications par rapport à la version précédente ».

Les usagers sont également invités à faire connaître dans les meilleurs délais leurs remarques, commentaires et suggestions, et à signaler toute erreur, omission ou imprécision constatées.

ORIGINE DE LA METHODE

La présente méthode s'appuie sur la directive européenne 2006-63-CE concernant la lutte contre *Ralstonia solanacearum*(Smith) Yabuuchi et coll. ; ainsi que sur l'arrêté du 31 juillet 2000 établissant la liste des organismes nuisibles aux végétaux, produits végétaux et autres objets soumis à des mesures de lutte obligatoire, dans lequel les souches responsables de la maladie de la Moko sont citées comme organisme contre lequel la lutte est obligatoire, de façon permanente, sur tout le territoire des DOM.

La méthode présentée ici permet de détecter les souches du complexe d'espèces *Ralstonia solanacearum* ; ainsi que les souches appartenant à l'écotype Moko et les souches variantes (IIB-4NPB) associées phylogénétiquement.

La méthode a été évaluée et rédigée par l'unité « Ravageurs et agents pathogènes tropicaux » (RAPT), du Laboratoire de la santé des végétaux.

Le travail de relecture et de révision a été effectué par l'unité « Coordination de la référence ».

PRINCIPALES MODIFICATIONS PAR RAPPORT A LA VERSION PRECEDENTE

Une modification concerne des parties clés ou le fond même de la méthode officielle, dont la prise en compte est susceptible d'améliorer significativement la portée ou le résultat de la méthode d'analyse. Sa prise en compte peut nécessiter des adaptations importantes, c'est pourquoi un délai est en règle générale accordé pour que les laboratoires de référence, agréés ou officiellement reconnus l'intègrent dans leur processus d'analyses. Dans certains cas, clairement précisés, une modification peut nécessiter une prise en compte immédiate par les laboratoires. En cas de modification majeure, le numéro de version est incrémenté d'une unité (exemple: la version v1c devient v2a). La méthode ainsi modifiée est considérée comme une nouvelle méthode.

Une amélioration est une modification mineure, qui apporte des précisions utiles ou pratiques, reformule les propos pour les rendre plus clairs ou plus précis, rectifie des erreurs bénignes. En cas d'amélioration, le numéro de version reste le même mais la lettre associée est incrémentée (exemple: la version v1c devient v1d). La méthode ainsi améliorée n'est pas considérée comme une nouvelle méthode.

MODIFICATIONS

Sans objet (première version publiée).

AMELIORATIONS

Sans objet (première version publiée).

DESCRIPTION DE LA METHODE

DETECTION DES SOUCHES SUR *MUSA SPP.* RESPONSABLES DE LA MALADIE DE LA MOKO ET DES VARIANTS IIB-4NPB DANS LE COMPLEXE D'ESPECES *RALSTONIA SOLANACEARUM*

Cette méthode est liée à la méthode officielle d'analyse MOA 022 « Techniques qualitatives d'amplification enzymatique des acides nucléiques » : elle ne peut être appliquée qu'en respectant les préconisations de cette méthode officielle.

1. Introduction

Contexte réglementaire

Ralstonia solanacearum est un organisme réglementé sur la liste sur la liste A2 de l'OEPP et est donc considéré comme organisme de quarantaine OEPP présent en Europe sans y être largement disséminé.

L'arrêté du 3 septembre 1990, complété par celui du 3 décembre 1991 (annexes DOM) précise l'inscription en annexe II (organisme dont l'introduction est interdite s'il se présente sur certains végétaux ou produits végétaux) de *R. solanacearum r*ace 2 (ou Maladie de Moko) pour les Antilles, la Guyane et la Réunion sur bananier et [des] *Musaceae* (Heliconia, strelitzia) ainsi que gingembre (*Zingiber officinalis*).

L'arrêté du 17 octobre 1995 relatif aux conditions d'entrée par dérogation de matériel végétal de bananiers dans les départements d'outre-mer permet, sous certaines conditions, l'importation de vitroplants de bananiers. Les exigences liées à l'importation de ce type de matériel végétal, sont spécifiées par l'intermédiaire d'un cahier des charges.

L'arrêté du 31 juillet 2000 établissant la liste des organismes nuisibles aux végétaux soumis à des mesures de lutte obligatoire, prévoit pour les quatre départements, l'inscription de *Ralstonia solanacearum* race 2 en annexe A (liste des organismes pour lesquels la lutte est obligatoire, de façon permanente sur tout le territoire).

Remarque : la race 2, ici citée, est l'ancienne classification des souches Moko.

Contexte épidémiologique

Le complexe d'espèces *Ralstonia solanacearum* présente une complexité importante au niveau phylogénétique et génomique. Les souches pathogènes du bananier sont classifiées dans le phylotype II, mais dans 4 sequevars différents : IIA-6 ; IIA-24 ; IIB-3 ; et IIB-4. Cet écotype Moko présente donc lui aussi une variabilité génétique, associé à un autre écotype émergent de sequevar IIB-4NPB, non pathogène de la banane Cavendish. Cependant, ces souches variantes sont capables de produire des infections latentes dans les tissus du plantain, sans pour autant provoquer de symptômes. Cette caractéristique confère à ces souches un potentiel de nuisibilité accru, car non détectable par un flétrissement de son hôte. De plus, ces deux types de souches présentent une proximité génétique importante. Les zones susceptibles d'héberger cette maladie sont de climat tropical, mais les échanges de matériels sont fréquents et favorisent la dissémination de cet organisme phytopathogène.

2. Objet

La présente méthode se propose de détecter les souches de *Ralstonia solanacearum* de l'écotype Moko, mais aussi les souches de ce même phylotype capables de s'immiscer dans les tissus de plantain sous forme latente : les souches variantes IIB-4NPB.

La technique utilisée se base sur une détection de première intention par un étalement sur milieu semi-sélectif gélosé, puis par une PCR permettant de détecter de façon générale les souches du complexe d'espèces *Ralstonia solanacearum*. Un test de seconde intention est réalisé par la suite, afin de confirmer la présence de souches de l'écotype Moko ou des souches variantes de phylotype IIB-4NPB.

Toutes ces méthodes sont qualitatives, c'est à dire qu'elles donnent un résultat du type « positif » ou « négatif ». Un résultat positif indique la présence de l'organisme cible dans une quantité d'échantillon donnée et dans la limite du seuil de détection de la technique employée. Un résultat négatif indique l'absence de l'organisme cible dans une quantité d'échantillon donnée et dans la limite du seuil de détection de la technique employée. La présente méthode est à utiliser pour les analyses officielles, notamment dans le cadre des contrôles phytosanitaires en surveillance du territoire, à l'import ou à l'export de végétaux.

3. Domaine d'application

Objets susceptibles d'être soumis à analyse

La méthode s'applique aux échantillons de pseudo-tronc de *Musa spp.*, sur plantes symptomatiques ou asymptomatiques.

Limitations relatives aux objets susceptibles d'être soumis à analyse

Les échantillons doivent arriver au laboratoire en bon état, non altérés par une décomposition des tissus ou autre.

Dans le cas contraire, le laboratoire émet des réserves sur tout résultat d'analyse négatif en précisant l'état dégradé de l'échantillon à la réception au laboratoire. Si les échantillons arrivent dans un état trop dégradé, le laboratoire peut refuser l'analyse. Le refus d'analyse doit être motivé et doit être notifié au client dans les plus brefs délais.

Grandeur de l'objet soumis à analyse

Le laboratoire réalise l'analyse sur un minimum de 2,0 g de matériel végétal frais.

En deçà de cette quantité de matériel végétal, des réserves sont émises quant au résultat d'analyse si ce dernier est négatif.

Précaution(s) particulière(s) à prendre

Le délai entre la réception de l'échantillon et le début de l'analyse doit être de préférence inférieur à 3 jours et ne doit pas dépasser 7 jours pour les échantillons frais prélevés dans de bonnes conditions. L'échantillon devra être conservé le plus longtemps à +5°C durant son acheminement ou stockage.

Ralstonia solanacearum a un statut de parasite de quarantaine réglementé. La bactérie doit être manipulée dans de strictes conditions de quarantaine en accord avec la directive 2008/61/CE. Les

exigences en termes de confinement pour la détention et la manipulation de cet agent pathogène sont de niveau de sécurité arrêté du L2 (arrêté du 16 juillet 2007).

4. Présentation schématique de la détection

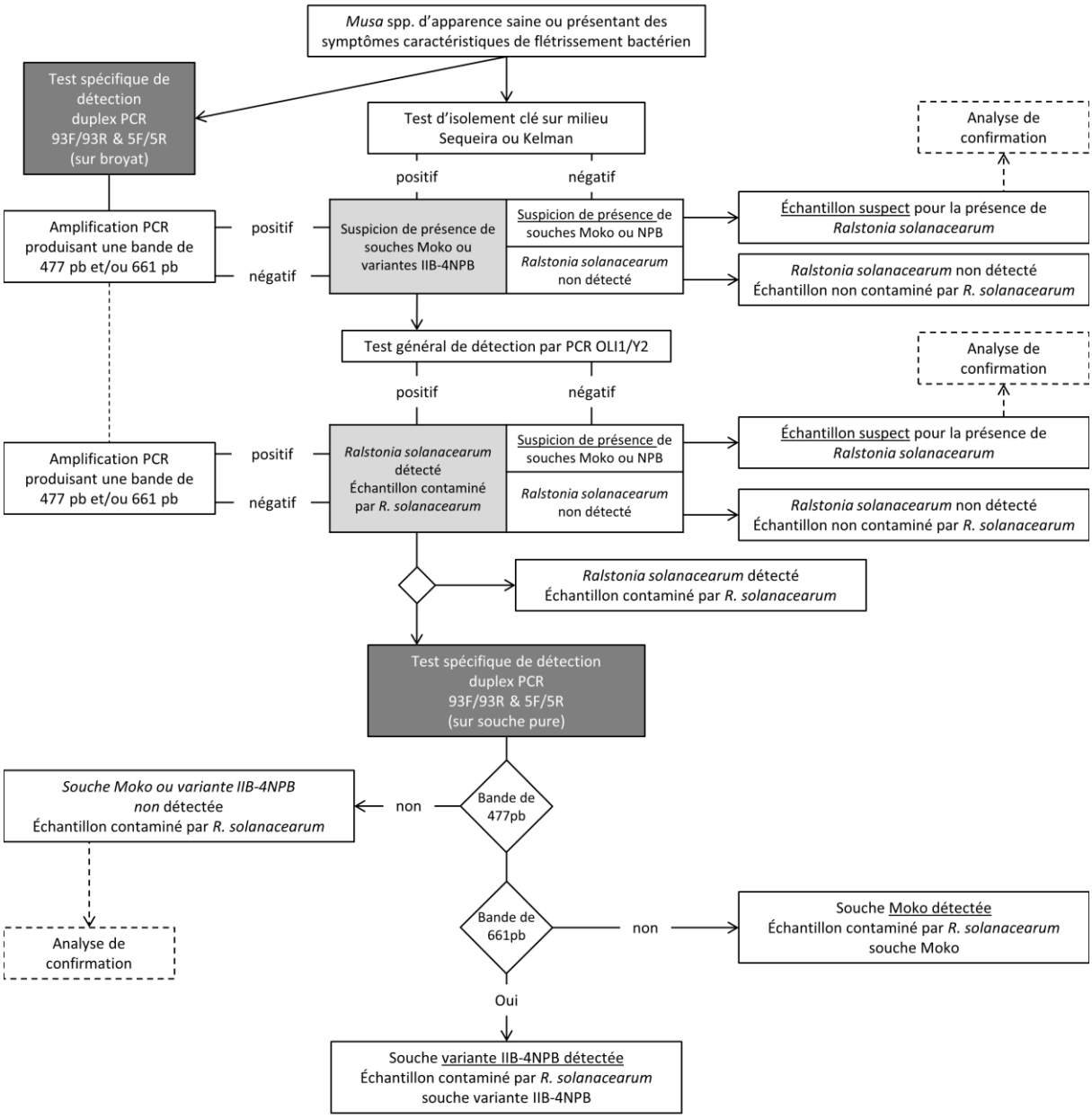


Figure 1 - Schéma de détection de *Ralstonia solanacearum*, des souches Moko et variantes IIB-4NPB

Deux tests de screening sont nécessaires à l'issu de l'étape de broyage : un isolement sur milieu sélectif et une duplex-PCR spécifique. Ces tests permettent de mettre en évidence une suspicion de présence de *R. solanacearum* souches Moko ou variantes IIB-4NPB dans l'échantillon. Dans le cas où l'isolement échoue mais la détection est positive, plusieurs raisons peuvent être avancées pour un état non cultivable des bactéries : forte dégradation de la population des cellules cibles, état VBNC (Viable But Not Cultivable) des cellules cibles, flore saprophytes compétitives trop importantes…

Un isolement positif de potentielles bactéries cibles amène aux étapes de biologie moléculaire par détection spécifique de *Ralstonia solanacearum*, puis des souches Moko ou variantes IIB-4NPB.

Détection et identification des souches Moko et variantes IIB-4NPB

Les laboratoires mettant en œuvre la détection des souches pathogènes ou latentes sur *Musa spp.* doivent réaliser deux tests de détection basés sur un principe de croissance et de biologie moléculaire :

- Isolement et duplex-PCR spécifique à partir du broyat végétal ;
- PCR simplex sur souches isolées (détection de *Ralstonia solanacearum*) ;
- PCR duplex sur souches précédemment identifiées comme *Ralstonia solanacearum* (détection des souches Moko et variantes IIB-4NPB de *Ralstonia solanacearum*).

Les résultats sont à interpréter de la façon suivante :

Étape 1 : dans le cadre de la première suspicion de détection sur broyat végétal par isolement sur milieu semi-spécifique et amplification moléculaire PCR, à l'aide des couples 93F/93R et 5F/5R :

- Un isolement positif de colonies caractéristiques et une amplification négative ou positive des bandes spécifiques de 477 pb / 661 pb indiquent la suspicion de présence de souches du complexe d'espèces *Ralstonia solanacearum ;*
- Un isolement négatif de colonies caractéristiques et une amplification négative des bandes spécifiques de 477 pb / 661 pb indiquent l'absence de souches du complexe d'espèces *Ralstonia solanacearum ;*
- Un isolement négatif de colonies caractéristiques et une amplification positive des bandes spécifiques de 477 pb / 661 pb indiquent la suspicion de présence de souches Moko ou variantes IIB-4NPB du complexe d'espèces *Ralstonia solanacearum* ; Une confirmation est nécessaire.

Étape 2 : dans le cadre de la première amplification PCR, à l'aide du couple Oli1/Y2 :

- Une taille de bande d'amplification par PCR de 288 pb indique la présence d'une souche du complexe d'espèces *Ralstonia solanacearum* ;
- L'absence de bande d'amplification par PCR indique l'absence de souche du complexe d'espèces *Ralstonia solanacearum*.

Étape 3 : dans le cadre de la seconde amplification PCR, à l'aide des couples 93F/93R et 5F/5R :

- Une taille de bande d'amplification par PCR de 477 pb indique la présence de l'écotype Moko du complexe d'espèces *Ralstonia solanacearum* ;
- Deux tailles de bande d'amplification par PCR de 477 pb et 661 pb, ou une taille de de bande d'amplification par PCR de 661 pb, indiquent la présence de variants IIB-4NPB du complexe d'espèces *Ralstonia solanacearum* ;
- L'absence de bande d'amplification par PCR indique que la souche précédemment identifiée comme *Ralstonia solanacearum* n'est pas de l'écotype Moko ou variants IIB-4NPB ; un test de confirmation est alors nécessaire.

Confirmation du statut des échantillons

- Dans le cadre d'un isolement négatif, mais d'une amplification spécifique par PCR des bandes de 477 pb / 661 pb, une analyse de confirmation est nécessaire.
- Dans le cadre d'une amplification spécifique par PCR des bandes de 477 pb / 661 pb sur broyat, mais d'une amplification négative à l'aide des amorces Oli1/Y2, une analyse de confirmation est nécessaire.
- Dans le cadre d'une amplification négative de la bande de 477 pb, mais d'une amplification positive à l'aide des amorces Oli1/Y2, une analyse de confirmation est nécessaire.

L'analyse de confirmation se fait à partir des reliquats d'échantillons primaires (pseudo-tronc de *Musa spp.*) si l'état de conservation de ces échantillons le permet; sinon elle se fait à partir de nouveaux prélèvements. Les reliquats d'analyse pertinents (broyats végétaux conservés à +5°C, éventuels extraits d'ADN conservés à une température ≤-18°C et isolats conservés sur boîte d'isolement en évitant de les prolonger au froid) doivent également être fournis au laboratoire réalisant l'analyse de confirmation.

5. Produits et consommables

En règle générale, l'opérateur 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 contaminations ou de tout autre élément pouvant interférer 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 les plus optimales.

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

Pour la composition des milieux, solutions et tests biochimiques, se reporter à la méthode officielle d'analyse MOA REP 001 répertoire des recettes.

5.1. Milieux et solutions

La liste des milieux et solutions nécessaires à la mise en œuvre de la méthode est la suivante :

- Milieux de culture pour l'isolement et repiquages : Kelman et Sequeira ;
- Kit d'amplification d'acides nucléiques ;
- Eau de qualité de biologie moléculaire pour les dilutions.

Contrôle :

Les milieux de culture sont des réactifs critiques pour la réalisation des isolements, en conséquence, chaque lot de fabrication d'un milieu (commercial ou fabriqué au sein du laboratoire), doit donner lieu à une vérification selon les préconisations de la MOA REP 001.

Conservation :

Les milieux de culture doivent être utilisés dans un délai de deux mois après fabrication. En cas de non utilisation dans ce délai, un nouveau contrôle de conformité du milieu est réalisé. En cas de changement de couleur, de signe d'évaporation/déshydratation ou prolifération microbienne, il convient d'éliminer tout le lot de milieu. Le stockage des milieux doit être réalisé à l'abri de la lumière, à une température positive ≤ 20°C.

5.1.1. Réactifs de biologie moléculaire

Certains réactifs sont critiques et conditionnent la performance des étapes d'extraction et d'amplification (eau de qualité de biologie moléculaire, mastermix ou core kit commercial de polymerase thermostable, dNTP, amorces). Ces réactifs doivent être utilisés et pour certains contrôlés conformément à la méthode officielle d'analyse MOA 022. Pour le choix des fournisseurs, un conseil peut être apporté par le laboratoire de référence et il est recommandé de contacter celui-ci en cas de doute sur le réactif adéquat.

Conservation : Les réactifs sont à conserver selon les recommandations des fournisseurs.

5.1.2. Tampons

Composition et préparation :

La liste des tampons nécessaires à la mise en œuvre de la méthode est la suivante :

- Tampon de broyage (TRIS) ;
- Tampon de migration pour l'électrophorèse (par exemple : TAE ou TBE) ;
- Tampon de charge (si celui-ci n'est pas intégré au tampon du master mix ; MOA REP 001).

Les tampons utilisés doivent être ceux préconisés par le fournisseur de réactifs. Le laboratoire peut aussi fabriquer certains tampons. Pour cela, le laboratoire se référera au répertoire des recettes en vigueur au Laboratoire de la santé des végétaux (MOA REP 001).

Conservation : Les préparations des tampons ainsi que leurs durées et conditions de conservation doivent être conformes aux recommandations du fournisseur ou au répertoire des recettes le cas échéant.

5.2. Oligonucléotides

Séquences des primers spécifiques pour la détection de *Ralstonia solanacearum* (Seal, et al. 1993).

- **Oli1** : 5' GGG GGT AGC TTG CTA CCT GCC 3'
- **Y2** : 5' CCC ACT GCT GCC TCC CGT AGG AGT 3'

Gène amplifié : ARN 16S ; Taille des bandes attendues : 288 pb.

Séquences des primers spécifiques pour la détection des souches Moko et souches variantes IIB-4NPB (Cellier et al., PLoS ONE soumis 2014).

- **93F** : 5' CGC TGC GCG GCC GTT TCA C 3'
- **93R** : 5' CGG TCG CGG CAT GGG CTT GG 3'

Gène amplifié : *kfrA* ; Taille des bandes attendues : 477 pb.

Séquences des primers spécifiques pour la détection des souches variantes IIB-4NBP (Cellier et al., PLoS ONE soumis 2014).

- **5F** : 5' GCG CGC GAG GCT GGT GAT GT 3'
- **5R** : 5' TGG GTT CGC AGG CGG ACA GC 3'

Gène amplifié : RAL70v1_1150031 (protéine de fonction inconnue) ; Taille des bandes attendues : 661 pb.

Les différents couples de primers sont commandés avec une méthode de purification standard : dessalés.

5.3. Autres consommables

- **Anses stériles ;**
- **Eau de qualité** « **analytique** » (*i.e.* déminéralisée, distillée, osmosée, HPLC…) stérilisée garantissant d'atteindre les critères de performance attendus pour les tests ;
- **Détergent** (et éventuellement un produit détergent désinfectant de type Aniospray) : désinfection des surfaces de travail et du matériel ;
- **Éthanol 70° et 90°** (et éventuellement un produit détergent désinfectant de type Aniospray) : désinfection des surfaces de travail et du matériel ;
- **Tubes** pour dilutions ;
- **Cônes stériles** avec et sans filtre de volume adaptés ;
- **Produits de décontamination de type DNA Away** : désinfection des surfaces de travail et du matériel à partir de l'étape d'extraction ;
- **Taq** polymérase et Mastermix (et tampons nécessaires dans le mastermix pour l'amplification moléculaire ; Le protocole a été évalué avec le mélange réactionnel du kit Gotaq® Hot Start Polymerase de Promega. Ce réactif n'étant plus produit, le mélange réactionnel du kit Gotaq® G2 Hot Start Polymerase de Promega a été validé et peut être utilisé en replacement) ;
- **Bromure d'éthidium** ;
- **Sachets de broyage avec filtre**.

6. Appareillage et matériel

Pour la mise en œuvre de cette méthode, le laboratoire disposera d'appareils courants de laboratoire de bactériologie et notamment :

- Étuve ou incubateur bactériologique réglé à 28°C ;
- Système thermostaté ou auto-préparateur de milieux ;
- Thermocycleur PCR ;
- Agitateur ;
- Enceinte réfrigérée à +5°C ;
- Congélateur -20°C ;
- Système de production d'eau déminéralisée ;
- Autoclave ;
- Balances, ayant une précision au gramme, au dixième et millième de gramme ;
- Broyeur à billes ou équivalent ;
- Micropipettes dispensant des volumes adaptés ;

Pour la partie PCR, se référer à la MOA022 ;

- Un thermocycleur (méthode validée sur Veriti® et GeneAmp® PCR System 9700, Applied Biosystems®, Life Technologies) ;
- Cuve électrophorèse ;
- Système d'acquisition d'images.

7. Contrôles et témoins

Des matériaux de référence doivent être inclus en cours de processus analytique pour valider les différentes étapes de la méthode. Leur observation et/ou lecture et conformité à l'attendu sont un préalable à l'interprétation des résultats obtenus sur les échantillons soumis à analyse. Les témoins sont de trois natures différentes :

- **Témoin négatif de processus** (E-) : matrice ne contenant pas l'organisme cible, traitée dans les mêmes conditions que les échantillons à analyser, déclarée non contaminée à l'issue de la manipulation (pseudo-tronc de *Musa spp.* non infecté).

- **Témoin positif de processus** (E+) : matrice contenant l'organisme cible, traitée dans les mêmes conditions que les échantillons à analyser, déclarée contaminée à l'issue de la manipulation. Il donne au minimum l'assurance d'un déroulement correct de la manipulation. Pour chaque série d'analyses, on peut soit utiliser un échantillon de référence naturellement contaminé ou un échantillon artificiellement contaminé par dopage avec une souche de *Ralstonia solanacearum* de référence.

- **Témoin négatif de PCR** (A- ou Teau) : il contient tous les éléments du mélange réactionnel mais aucun extrait d'ADN n'est ajouté, uniquement de l'eau ; cela permet de vérifier l'absence de contamination au cours de la réaction de PCR.
- **Témoin positif de PCR** (A+) : ADN de *Ralstonia solanacearum* souches Moko (IIA-6, IIA-24, IIB-3, IIB-4) et ADN de *Ralstonia solanacearum* souches 4NPB permettant de vérifier le bon fonctionnement de l'amplification moléculaire.

Remarque : dans la présente méthode, les souches utilisées comme témoin positif lors de l'isolement et du test PCR sont des souches de référence de Ralstonia solanacearum. Des isolats du laboratoire, préalablement vérifiés sur milieu, en test moléculaire et de pouvoir pathogène et déposés à la CIRM-CFBP[1], peuvent également être utilisés comme souches témoins de référence. La manipulation de ces souches témoins positifs doit s'effectuer de manière séparée dans l'espace et/ou dans le temps de façon à éviter toute contamination accidentelle des échantillons.

Les témoins de processus doivent faire l'objet de deux puits PCR. Les témoins de PCR peuvent faire l'objet d'un puits unique.

D'autres contrôles peuvent être ajoutés si nécessaire et sont définis par la norme XP V03-043. L'utilisation de ces références sert à valider le bon déroulement des différentes étapes de l'analyse ainsi que les résultats obtenus sur les différentes plaques. Leur observation et/ou lecture et conformité à l'attendu sont un préalable à l'interprétation des résultats obtenus sur les échantillons soumis à analyse.

[1] CIRM - CFBP* : Centre International de Ressources Microbiennes – Collection Française de Bactéries associées aux Plantes

8. Etapes de l'analyse

8.1. Prise d'analyse

Chaque extrémité de l'échantillon sera rafraichie par une coupe transversale, permettant d'éliminer les parties sèches. Les premières feuilles enroulées seront enlevées afin d'éviter les contaminations externes de l'échantillon. Enfin, la prise d'essais des échantillons se calibre sur le poids de 2,0 g de matériel végétal frais, excisé à l'aide d'un scalpel.

Entre chaque échantillon, l'opérateur veillera à désinfecter le matériel utilisé pour les prélèvements.

8.2. Broyage des pseudo-troncs

Les prises d'essai sont placées dans des sachets de broyage adaptés au type de broyeur (ex HOMEX 6). Ajouter 5 mL de tampon de broyage TRIS (annexe 1) afin de libérer et re-suspendre les potentielles colonies cibles de *R. solanacearum*. Néanmoins, le broyage peut se faire à l'aide d'un pilon autoclavé ou nettoyé et flambé à l'éthanol 70° ou 90°, ou dilacéré en fine particules à l'aide d'une lame de scalpel stérile. Un temps d'attente de 10 min après broyage est nécessaire pour un rendement optimal de souches cibles de *R. solanacearum*. A l'issue de cette étape, transférer 1,5 mL de suspension dans un tube de type Eppendorf de 2 mL afin de réaliser les étapes de détection ultérieures. Aucune extraction PCR n'est nécessaire par la suite du protocole.

Remarque : dans le cas d'un traitement différé de l'échantillon en solution, il est fortement recommandé de le conserver à une température ambiante (environ 25°C) pendant moins de 2h ; dans le cas contraire, une exposition prolongé au froid ou à des températures trop basses entrainerait une probable impossibilité de culture des souches cibles de R. solanacearum sur boites de Pétri gélosées.

8.3. Isolement sur boite de Pétri gélosée

Une fraction de 50 µL de l'échantillon fraichement suspendu est étalée selon la méthode par épuisement en « trois secteurs » sur milieu gélosé de Kelman (Annexe 2) et de Sequeira modifié (Annexe 3). Le milieu Sequeira peut être substitué par le milieu SMSA de Englebrecht (1994) modifié par Elphinstone et al. (1996) (Annexe 4). Un total de deux répétitions est nécessaire par milieu pour assurer un isolement robuste sur boites de Pétri gélosées.

L'incubation des boîtes de Petri gélosées se fait à 28°C ± 3°C pendant 2 à 6 jours. Le temps indiqué ici est variable, car les souches cibles de *R. solanacearum* de l'écotype Moko présentent une croissance lente. Le milieu de Sequeira ou SMSA ne permettant pas une croissance optimale des souches Moko, une utilisation en parallèle du milieu de Kelman est obligatoire.

L'aspect des colonies sur milieu gélosé, aspect fluide et muqueux, a été rapidement corrélé avec le un pouvoir pathogène actif. La coloration est uniforme blanc-crème pouvant prendre une coloration rouge-rosé et elliptique au centre, surtout lorsque la colonie a atteint une maturité de croissance. *A contrario*, les colonies possédant un aspect rugueux et sec présentent souvent un phénotype non virulent. Les souches peuvent présenter une croissance de larges colonies muqueuse ou de petites colonies, sous l'aspect d'une tête d'épingle peu muqueuse (notamment le cas des Moko IIB-4).

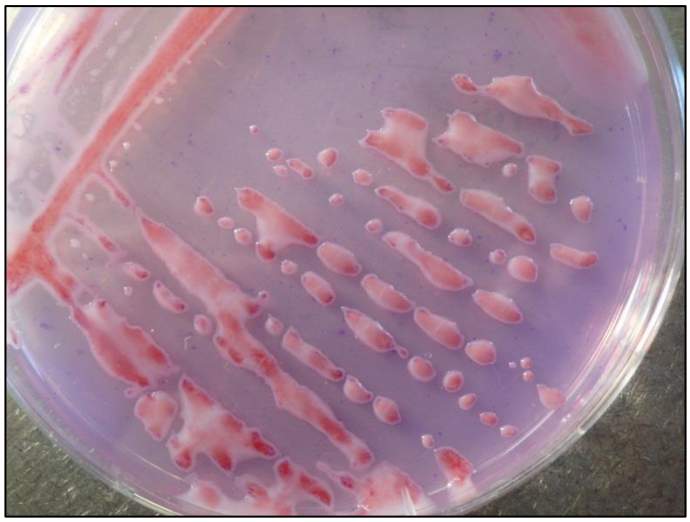


Photo 1 - Colonies typiques de *Ralstonia solanacearum* sur milieu gélosé de Sequeira modifié

Tout échantillon présentant au moins une colonie typique de *R. solanacearum* (ou suspecte) sur au moins une boîte de culture doit faire l'objet d'une identification. Le repiquage se fera sur une autre boite de Pétri de Kelman en re-suspendant la colonie dans un volume approprié de Tris-HCL ou d'eau HPLC (généralement 200 à 500 µL, en fonction de la taille) et en l'étalant en « trois secteurs », puis en l'incubant selon les mêmes modalités décrites précédemment.

Les souches suspectes sont suspendues dans un volume adapté d'eau HPLC uniquement et serviront pour les réactions d'amplification moléculaire PCR :

- Pour une anse de 1 µL (1,45 mm) utilisée pour prélever une colonie, un volume de 200 µL sera nécessaire pour sa suspension.
- Pour une anse de 10 µL (4,00 mm) utilisée pour prélever une colonie, un volume de 500 µL sera nécessaire pour sa suspension.

Remarque : il est important de prélever les colonies repiquées depuis 24h dans le cas d'une croissance normale et de considérer 48h pour des colonies à croissance lente. Les anses de prélèvement ne doivent pas être surchargées en colonie pour permettre une bonne amplification moléculaire PCR.

Les suspensions seront vortexées afin d'éliminer les agglomérats bactériens et de produire une suspension homogène et trouble. Elles seront stockées à une température ≤ -18°C, pour une utilisation différée ou d'un stockage longue durée.

8.4. Amplification PCR spécifique des souches Moko et variantes IIB-4NPB sur broyat végétal

8.4.1. Mélange réactionnel

Tableau 1 - Mix réactionnel pour la PCR 93F/93R de détection des souches Moko et variantes IIB-4NPB

Réactifs	[Cf]		[Ci]		[Puits]
Eau					13.88
Buffer	1	x	5	x	5
MgCl2	1.5	mM	25	mM	1.5
dNTPs	0.2	mM	10	mM	0.5
Primer 93F	2	µM	100	µM	0.5
Primer 93R	2	µM	100	µM	0.5
Primer 5F	2	µM	100	µM	0.5
Primer 5R	2	µM	100	µM	0.5
GoTaq® Hot Start Polymerase (Promega)	0.625	U	5	U/µL	0.125
Broyat végétal					2
				Total	**25**

[Ci] : Concentration des solutions mères ; [Cf] : concentration finale dans le mix réactionnel ; [Puits] : volume final en µL dans chaque puits PCR réactionnel.

Remarques :

- *Le volume final est de 25 µL dans chaque puits soit 23 µL de mélange réactionnel et 2 µL de suspension bactérienne ou d'eau (dans le cadre du témoin négatif de PCR) ;*
- *Le protocole a été caractérisé et validé avec le mélange réactionnel du kit Gotaq® Hot Start Polymerase de Promega. Ce réactif n'étant plus produit, le mélange réactionnel du kit Gotaq® G2 Hot Start Polymerase (Promega) a également été testé et validé ; il peut être utilisé en replacement. S'agissant d'un réactif critique, l'utilisation d'un autre mélange réactionnel est assujettie aux dispositions du point « modifications des méthodes officielles » en préambule. Dans ce kit, le tampon est disponible soit avec le tampon de charge déjà mélangé, soit sans le tampon de charge. La validation a été réalisée avec le tampon contenant le tampon de charge ;*
- *Établir soigneusement le plan de distribution (plan de plaque) et d'identification des extraits. Chaque échantillon est déposé deux fois soit deux puits par échantillon (analyse d'identification).*

8.4.2. Dépôt des ADN

Déposer deux puits PCR par prise d'essai pour les échantillons et deux puits selon les différents témoins.

8.4.3. Cycles thermiques PCR

Tableau 2 - Cycle PCR 93F/93R pour la détection des souches Moko et variants IIB-4NPB

Étapes	Température (°C)	Durée	Cycles
Dénaturation initiale	96	5 min	
Dénaturation	94	15 s	
Hybridation	70	30 s	35
Elongation	72	30 s	
Elongation finale	72	10 min	
Conservation	12	∞	

8.5. Amplification PCR générale pour *Ralstonia solanacearum*

8.5.1. Préparation du mélange réactionnel

Tableau 3 - Mix réactionnel pour la PCR OLI1/Y2 de détection des souches de *Ralstonia solanacearum*

Réactifs	[Cf]	[Ci]	[Puits]
Eau			10.88
Buffer	1 x	5 x	5
MgCl2	1.5 mM	25 mM	1.5
dNTPs	0.2 mM	10 mM	0.5
Primer Oli1	1 µM	10 µM	2.5
Primer Y2	1 µM	10 µM	2.5
GoTaq® Hot Start Polymerase (Promega)	0.625 U	5 U/µL	0.125
Suspension bactérienne			2
		Total	**25**

[Ci] : Concentration des solutions mères ; [Cf] : concentration finale dans le mix réactionnel ; [Puits] : volume final en µL dans chaque puits PCR réactionnel.

Remarque :

Se reporter aux remarques page 21 §8.4.1

8.5.2. Dépôt des ADN

Déposer deux puits PCR par prise d'essai pour les échantillons et deux puits selon les différents témoins.

8.5.3. Cycles thermiques PCR

Tableau 4 - Cycle PCR OLI1/Y2 pour la détection des souches du complexe d'espèces *Ralstonia solanacearum*

Étapes	Température (°C)	Durée	Cycles
Dénaturation initiale	96	2min	
Dénaturation	94	20s	
Hybridation	68	20s	35
Elongation	72	30s	
Elongation finale	72	10min	
Conservation	12	∞	

8.6. Amplification PCR spécifique des souches Moko et variantes IIB-4NPB

8.6.1. Mélange réactionnel

Tableau 5 - Mix réactionnel pour la PCR 93F/93R de détection des souches Moko et variants IIB-4NPB

Réactifs	[Cf]	[Ci]	[Puits]
Eau			13.88
Buffer	1 x	5 x	5
MgCl2	1.5 mM	25 mM	1.5
dNTPs	0.2 mM	10 mM	0.5
Primer 93F	2 µM	100 µM	0.5
Primer 93R	2 µM	100 µM	0.5
Primer 5F	2 µM	100 µM	0.5
Primer 5R	2 µM	100 µM	0.5
GoTaq® Hot Start Polymerase (Promega)	0.625 U	5 U/µL	0.125
Suspension bactérienne			2
		Total	**25**

[Ci] : Concentration des solutions mères ; [Cf] : concentration finale dans le mix réactionnel ; [Puits] : volume final en µL dans chaque puits PCR réactionnel.

<u>Remarque :</u>

Se reporter aux remarques page 21 §8.4.1

8.6.2. Dépôt des ADN

Déposer deux puits PCR par prise d'essai pour les échantillons et deux puits selon les différents témoins.

8.6.3. Cycles thermiques PCR

Tableau 6 - Cycle PCR 93F/93R pour la détection des souches Moko et variants IIB-4NPB

Étapes	Température (°C)	Durée	Cycles
Dénaturation initiale	96	5 min	
Dénaturation	94	15 s	
Hybridation	70	30 s	35
Elongation	72	30 s	
Elongation finale	72	10 min	
Conservation	12	∞	

8.7. Électrophorèse et révélation

Déposer 10 µL de l'amplifiât, soit directement soit mélangé à du bleu de charge (environ 1 µL pour 10 µL d'amplifiât) selon le type de tampon utilisé précédemment (cf. remarque §8.4.1 / 8.5.1 / 8.6.1), sur un gel d'agarose à 2% (poids/poids).

Un marqueur de taille moléculaire, dont l'intervalle encadre la taille des fragments attendus, doit être déposé sur chaque ligne de dépôt afin de définir la taille des fragments obtenus.

Effectuer l'électrophorèse dans du tampon de migration à concentration identique à celui utilisé pour réaliser le gel (à titre indicatif, la migration peut se faire avec les paramètres suivants : 90 volts durant 45 min).

La coloration du gel se fait dans un bain de bromure d'éthidium (BET) et la révélation sous UV. Il est conseillé d'effectuer une prise de vue du gel et d'utiliser une impression papier ou le fichier informatique pour analyser les résultats.

D'autres marqueurs d'ADN équivalents peuvent également être utilisés.

<u>Remarque :</u> Veiller à la protection des utilisateurs contre les UV (yeux, peau). Veiller également à la protection des utilisateurs lors de la manipulation du BET ou tout autre marqueur d'ADN par le port de gants nitriles. Tous les déchets ayant été en contact avec ces marqueurs d'ADN doivent être éliminés selon une procédure adaptée à ces déchets toxiques.

8.8. Résultats

8.8.1. Analyse et interprétation des résultats du screening de détection

Tableau 7 - Matrice de décision pour le screening de *Ralstonia solanacearum*

<table>
<tr><td colspan="2" rowspan="2"></td><td colspan="2">Test d'isolement sur milieu Sequeira ou Kelman</td></tr>
<tr><td>+</td><td>-</td></tr>
<tr><td rowspan="2">Test spécifique de détection duplex-PCR 93F/93R & 5F/5R (sur broyat végétal)</td><td>+</td><td rowspan="2">Suspicion de présence de souches Moko ou variantes IIB-4NPB

(1)</td><td><u>Présence suspectée</u> de souches Moko ou variantes NPB dans l'échantillon xx par méthode PCR conventionnelle. Le cas échéant : l'échantillon a été transmis au laboratoire xx pour confirmation.</td></tr>
<tr><td>-</td><td>Ralstonia solanacearum <u>non détectée</u> dans l'échantillon xx par méthode d'isolement sur milieu sélectif et par PCR conventionnelle</td></tr>
</table>

(1) Les analyses ne permettent pas de statuer : la présence de souches Moko ou variantes IIB-4NPB est suspectée ; poursuivre le schéma de détection

- Dans le cas où l'isolement de *R. solanacearum* est positif sur milieu semi-sélectif, la poursuite du protocole est obligatoire.

- Dans le cas où l'isolement de *R. solanacearum* est négatif sur milieu semi-sélectif, mais que la duplex-PCR spécifique est positive, on interprètera de la façon suivante : « Suspicion de présence de souches Moko ou variantes NPB dans l'échantillon xx par méthode PCR conventionnelle. ». L'échantillon sera soumis pour confirmation.

- Dans le cas où l'isolement de *R. solanacearum* est négatif sur milieu semi-sélectif, et que la duplex-PCR spécifique est négative, on interprètera de la façon suivante : « *Ralstonia solanacearum* non détectée dans l'échantillon xx par méthode d'isolement sur milieu sélectif et par PCR conventionnelle. ».

8.8.2. Analyse et interprétation de détection générale

Tableau 8 - Matrice de décision pour la détection générale de *Ralstonia solanacearum*

<table>
<tr><td colspan="2" rowspan="2"></td><td colspan="2">Test général d'identification par PCR Oli1/Y2</td></tr>
<tr><td>+</td><td>-</td></tr>
<tr><td rowspan="2">Précédent résultat du Test spécifique de détection duplex-PCR 93F/93R & 5F/5R
(sur broyat végétal)</td><td>+</td><td rowspan="2">*Ralstonia solanacearum* détectée dans l'échantillon xx par méthode PCR conventionnelle Oli1/Y2

(1)</td><td>Présence suspectée de souches Moko ou variantes NPB dans l'échantillon xx par méthode PCR conventionnelle. Le cas échéant : l'échantillon a été transmis au laboratoire xx pour confirmation.</td></tr>
<tr><td>-</td><td>*Ralstonia solanacearum* non détectée dans l'échantillon xx par méthode d'isolement sur milieu sélectif et par PCR conventionnelle Oli1/Y2</td></tr>
</table>

(1) Les analyses permettent de décrire la présence de R. solanacearum dans l'échantillon ; poursuivre le schéma de détection

8.8.3. Analyse et interprétation des résultats dans le cas d'une analyse de résultat PCR :

- Le résultat d'un puits PCR est positif s'il présente une bande à la taille attendue ;
- Le résultat d'un puits PCR est négatif s'il ne présente aucune bande à la taille attendue.

L'analyse est validée si les conditions de la table 3 sont vérifiées :

Tableau 9 - Matrice de décision pour l'interprétation des résultats des contrôles PCR

Type de contrôle	Résultats attendus		
	Puits 1	Puits 2	Final
Témoin négatif de processus (E-)	-	-	NÉGATIF
Témoin positif de processus (E+)	+	+	POSITIF
Témoin négatif de PCR (A-)	-	-*	NÉGATIF
Témoin positif de PCR (A+)	+	+*	POSITIF

**La duplication de ce témoin est facultative*

Ainsi, à l'issu des étapes d'amplification PCR :

- Le résultat d'un puits PCR est positif pour la détection de *Ralstonia solanacearum* s'il présente une bande d'amplification PCR à l'aide des amorces Oli1/Y2 à la taille attendue de 288 pb ;

- Le résultat d'un puits PCR est positif pour la détection de *Ralstonia solanacearum*, écotype Moko s'il présente une bande d'amplification PCR à l'aide des amorces en duplex 93F/93R et 5F/5R à la taille attendue de 477 pb ;

- Le résultat d'un puits PCR est positif pour la détection de *Ralstonia solanacearum*, variants IIB-4NPB s'il présente deux bandes d'amplification PCR à l'aide des amorces en duplex 93F/93R et 5F/5R à la taille attendue de 477 pb et 661 pb ;

- Le résultat d'un puits PCR est négatif s'il ne présente aucune bande ou une bande d'une autre taille que celles attendues à 288 pb pour le couple Oli1/Y2 ; et 477 pb ou 661 pb pour les couples en duplex 93F/93R et 5F/5R.

Tableau 10 - Matrice de décision pour l'interprétation des résultats d'analyse

Analyse Puit 1	Analyse Puit 2	Résultat
+	+	**POSITIF**
+	-	**PCR à refaire** Si à nouveau au moins 1 positif sur 2, le test est interprété comme positif
-	-	**NEGATIF**

8.8.4. Formulation des résultats de biologie moléculaire

La formulation des résultats sur le rapport d'analyse doit se faire de la façon suivante :

Tableau 11 - Formulation des résultats d'amplification PCR

Test PCR sur suspension bactérienne				
Couples d'amorces	**Oli1/Y2**	**93F/93R & 5F/5R**		**Oli1/Y2 ou 93F/93R & 5F/5R**
Résultat	**POSITIF**	**POSITIF**	**POSITIF**	**NÉGATIF**
Taille de bande d'amplification PCR	288 pb	477 pb	477 pb & 661 pb	Néant ou bandes d'amplification différentes
Interprétation	*Ralstonia solanacearum* détectée dans l'échantillon xx par méthode PCR conventionnelle	Souche Moko du complexe d'espèces *Ralstonia solanacearum* détectée dans l'échantillon xx par méthode PCR conventionnelle	Souche variante IIB-4NPB du complexe d'espèces *Ralstonia solanacearum* détectée dans l'échantillon xx par méthode PCR conventionnelle	*Ralstonia solanacearum* non détectée dans l'échantillon xx par méthode PCR conventionnelle

Dans le cas d'une amplification spécifique de la duplex-PCR sur broyat et d'une non-amplification sélective de la simplex Oli1/Y2, l'échantillon est déclaré sous un statut de « Échantillon suspect pour la présence de *R. solanacearum* ».

9. Analyses de confirmation

Une analyse de confirmation doit être réalisée :

- Systématiquement pour les échantillons pour lesquels une amplification PCR a été obtenue à l'aide des amorces en duplex 93F/93R & 5F/5R, mais qu'aucun isolement de cellules cibles n'a pu être réalisé ;

- Systématiquement pour les échantillons pour lesquels une bande d'amplification PCR de 288 pb a été obtenue à l'aide des amorces oli1/Y2, mais aucune bande amplifiée à l'aide des amorces en duplex 93F/93R & 5F/5R ;

- Au cas par cas pour les échantillons pour lesquels l'amplification obtenue est insuffisante ou non répétable, pour permettre de statuer clairement sur le caractère positif ou négatif de l'échantillon.

Cette confirmation se fait à partir de la suspension bactérienne ou, à défaut, des reliquats d'échantillons primaires (pseudo-tronc) ou si l'état de conservation de ces échantillons le permet ; sinon elle se fait à partir de nouveaux prélèvements.

Les reliquats d'analyse pertinents (pseudo-tronc surnuméraires conservées à +5°C et suspensions bactériennes conservés à une température ≤ -18°C) doivent également être fournis au laboratoire réalisant l'analyse de confirmation.

10. Élimination des matériels susceptibles d'être contaminants

Les cellules de *Ralstonia solanacearum* sont adaptées à une survie dans un hôte et dans des milieux pauvres en nutriments (eau d'irrigation, sol…). Les structures cellulaires hôtes ne sont pas indispensables à leur survie. Il est donc nécessaire de détruire les tissus végétaux constituant l'échantillon pour éviter leur maintien et éventuellement leur dissémination, ainsi que de désinfecter les surfaces de travail et les mains du manipulateur.

Les insectes vecteurs ne peuvent pas constituer une source de dissémination.

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.

Ainsi, tout fragment de matériel végétal infecté (ou de statut indéterminé) doit être détruit par autoclavage ou autre moyen inactivant cette bactérie.

Les consommables ayant été en contact avec le matériel végétal infecté (ou de statut indéterminé) doivent être autoclavés (sachet de broyage, tube, plaque de microtitration et PCR…).

Le matériel ayant été en contact avec le végétal infecté (ou de statut indéterminé) doit être désinfecté.

11. Conservation des reliquats de matériels 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, jusqu'à au moins le 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 partie de ces reliquats lui soient transmis, aux frais des laboratoires agréés ou reconnus, dans le cadre des missions qui lui sont confiées.

REMERCIEMENTS

L'unité RAPT remercie le CIRAD Réunion (UMR PVBMT) pour sa collaboration dans les collections de souches, ainsi que l'unité « Coordination de la Référence » du Laboratoire de la Santé des Végétaux pour la relecture de la méthode.

LISTE DES DOCUMENTS OFFICIELS APPELES PAR LA METHODE

Référence	Titre
MOA REP 001	Répertoire des recettes en vigueur au Laboratoire de la Santé des Végétaux
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
Norme XP V03 - 043	Exigences générales pour la réalisation d'analyses utilisant la biologie moléculaire pour la détection et l'identification d'organismes pathogènes, d'altération et ravageurs des végétaux et produits dérivés
ISO 17025	Exigences générales concernant la compétence des laboratoires d'étalonnages et d'essais
Directive 2000/29/CE	concernant les mesures de protection contre l'introduction dans la Communauté d'organismes nuisibles aux végétaux ou aux produits végétaux et contre leur propagation à l'intérieur de la Communauté
Arrêté du 31 juillet 2000 modifié par l'arrêté du 25 aout 2011	Établissant la liste des organismes nuisibles aux végétaux soumis à des mesures de lutte obligatoire
GLO 001	Glossaire des termes techniques en vigueur au Laboratoire de la santé des végétaux
Directive 2006/63/CE	concernant la lutte contre *Ralstonia solanacearum*(Smith) Yabuuchiet al.
Directive 2008/61/CE	fixant les conditions dans lesquelles certains organismes nuisibles, végétaux, produits végétaux et autres objets énumérés aux annexes I à V de la directive 2000/29/CE du Conseil peuvent être introduits ou circuler dans la Communauté ou dans certaines zones protégées de la Communauté pour des travaux à des fins d'essai ou à des fins scientifiques ou pour des travaux sur les sélections variétales
Arrêté du 16 juillet 2007	fixant les mesures techniques de prévention, notamment de confinement, à mettre en œuvre dans les laboratoires de recherche, d'enseignement, d'analyses, d'anatomie et cytologie pathologiques, les salles d'autopsie et les établissements industriels et agricoles où les travailleurs sont susceptibles d'être exposés à des agents biologiques pathogènes
PM 7/21	Protocoles de diagnostic pour les organismes réglementés (*Ralstonia solanacearum*)

ANNEXE 1 – Composition du tampon de broyage TRIS

La composition du tampon de broyage TRIS pour **1L** est la suivante :

Composants	Masse Molaire (g/mol)	Concentration finale	Poids (g)
Tris-HCL - pH 8.0	121,135	25 mM	3,029
		Eau distillée	**Qsp 1 L**

Étapes de fabrication :

- Peser le TRIS et le mettre en solution dans une le volume final d'eau distillée ;
- Contrôler le pH et ajuster si nécessaire à 8,00 ;
- Autoclaver le tampon ;

Consignes d'utilisation :

N'utilisez le tampon de broyage qu'à température ambiante et le conserver à +5°C pour une durée maximale de 3 mois.

ANNEXE 2 - Recette du milieu gélosé de Kelman

Pour 1 L de milieu

- 11,0 g Bacto-Peptone (Difco) ;
- 6,3 g Glycérol ;
- 18,0 g Bacto-Agar (Difco) ;
- 1,0 g Extrait de levure.

Après Autoclave, laisser le milieu refroidir à environ 47°C et ajouter :

- 5 mL d'une solution à 1% Chlorure de 2,3,5-triphényltétrazolium (Sigma) ;
- Ajuster le pH = 7,20.

Consignes d'utilisation :

N'utilisez le milieu gélosé de Kelman qu'à température ambiante et le conserver à une température < 20°C à l'abri de la lumière pour une durée maximale de 2 mois.

ANNEXE 3 - Recette du milieu gélosé de Sequeira modifié

Pour 1 L de milieu

- 11,0 g Bacto-Peptone (Difco) ;
- 6,3 g Glycérol ;
- 18,0 g Bacto-Agar (Difco) ;
- 1,0 g Extrait de levure.

Après Autoclave, laisser le milieu refroidir à 47°C ±2°C et ajouter :

- 25 mg Chlorure de 2,3,5-triphényltétrazolium (Sigma) ;
- 2 mg Crystal Violet (Sigma C-6158) ;
- 5 mg Chloramphénicol (Sigma C-3175) ;
- 20 U Pénicilline G (Sigma P-3032) ;
- 10 mg Sulfate de polymixine-B (Sigma P-1004) ;
- 20 mg Tyrothricine ;
- Ajuster le pH = 7,20.

Consignes d'utilisation :

N'utilisez le milieu gélosé de Sequeira modifié qu'à température ambiante et le conserver à une température < 20°C à l'abri de la lumière pour une durée maximale de 3 mois.

ANNEXE 4 - Recette du milieu gélosé SMSA (Englebrecht, 1994, modifiée par Elphinstone et coll., 1996)

Pour 1 L de milieu

- 11,0 g Bacto-Peptone (Difco) ;
- 6,3 g Glycérol ;
- 15,0 g Bacto-Agar (Difco) ;
- 1,0 g Extrait de levure.

Après Autoclave, laisser le milieu refroidir à 47°C ±2°C et ajouter :

- 50 mg Chlorure de 2,3,5-triphényltétrazolium (Sigma) ;
- 5 mg Crystal Violet (Sigma) ;
- 5 mg Chloramphénicol (Sigma C-3175) ;
- 0,5 mg Pénicilline G (~825 U) (Sigma P-3032) ;
- 100 mg Sulfate de polymixine-B (~600 000 U) (Sigma P-1004) ;
- 25 mg Bacitracine (~1250 U) (Sigma B-0125);
- Ajuster le pH = 7,20.

Pour une inhibition supplémentaire des champignons ou d'autres flores telluriques, ajouter :

- 100 mg Cycloheximide (1%) (Sigma C-4859)

<u>Consignes d'utilisation :</u>

N'utilisez le milieu gélosé de Sequeira modifié qu'à température ambiante et le conserver à une température < 20°C à l'abri de la lumière pour une durée maximale de 3 mois.

BIBLIOGRAPHIE SUCCINCTE

2000. Council Directive 2000/29/EC concerning protective measures against the introduction into the Community of organisms harmful to plants or plant products and against their spread within the Community, p. 112. *In* E. Communities (ed.), Official Journal L169, vol. Council Directive 2000/29/EC.

2006. Council Directive 2006/63/EC amending Annexes II to VII to Council Directive 98/57/EC on the control of *Ralstonia solanacearum* (Smith) Yabuuchi et al., p. 71. *In* E. Communities (ed.), Official Journal L206/36, vol. Council Directive 2006/63/EC.

Cellier, G., B. Remenant, F. Chiroleu, P. Lefeuvre, and P. Prior. 2012. Phylogeny and population structure of brown rot and Moko disease-causing strains of *Ralstonia solanacearum* phylotype II. Appl. Environ. Microbiol. **78:**2367-2375.

Elphinstone, J. G., J. K. Hennessy, J. K. Wilson, and D. E. Stead. 1996. Sensitivity of different methods for the detection of *Ralstonia solanacearum* in potato tuber extracts. EPPO Bulletin **26:**663-678.

Englebrecht, M. C. 1994. Modification of a selective medium for the isolation and quantification of *Pseudomonas solanacearum*. ACIAR Bacterial Wilt Newsletter **10:**3-5.

Fegan, M., and P. Prior. 2005. How complex is the "*Ralstonia solanacearum* species complex", p. 449-461. *In* C. Allen, P. Prior, and A. C. Hayward (ed.), Bacterial wilt disease and the *Ralstonia solanacearum* species complex. APS Press, St Paul, MN.

Fegan, M., and P. Prior. 2006. Diverse members of the *Ralstonia solanacearum* species complex cause bacterial wilts of banana. Australas. Plant Pathol. **35:**93-101.

Hayward, A. C. 1991. Biology and epidemiology of bacterial wilt caused by *Pseudomonas solanacearum*. Annu. Rev. Phytopathol. **29:**65-87.

Seal, S. E., L. A. Jackson, J. P. Young, and M. J. Daniels. 1993. Differentiation of *Pseudomonas solanacearum*, *Pseudomonas syzygii*, *Pseudomonas pickettii* and the Blood Disease Bacterium by partial 16S rRNA sequencing: construction of oligonucleotide primers for sensitive detection by polymerase chain reaction. J. Gen. Microbiol. **139:**1587-1594.

Sequeira, L. 1998. Bacterial wilt: the missing element in international banana improvement programs, p. 6-14. *In* P. Prior, C. Allen, and J. Elphinstone (ed.), Bacterial Wilt Disease: Molecular and Ecological Aspects. INRA Editions, Paris, France.

Swanson, J. K., J. Yao, J. Tans-Kersten, and C. Allen. 2005. Behavior of *Ralstonia solanacearum* Race 3 biovar 2 during latent and active infection of geranium. Phytopathology **95:**136-143.

Wicker, E., L. Grassart, R. Coranson-Beaudu, D. Mian, C. Guilbaud, M. Fegan, and P. Prior. 2007. *Ralstonia solanacearum* strains from Martinique (French West Indies) exhibiting a new pathogenic potential. Appl. Environ. Microbiol. **73:**6790-6801.

Pour toute demande à caractère scientifique et technique relative à ce document, le point de contact national désigné par le ministère chargé de l'agriculture est le laboratoire national de référence concerné :

ANSES

Laboratoire de la santé des végétaux

Station de la Réunion

Unité Ravageurs et Agents Pathogènes Tropicaux

Pôle de protection des plantes

7, chemin de l'Irat

97410 SAINT PIERRE

lsv@anses.fr

Ce document est édité par :

Ministère de l'alimentation, de l'agriculture et de la pêche

Direction générale de l'alimentation

Service de la prévention des risques sanitaires de la production primaire

Sous-direction de la qualité et de la protection des végétaux

251 rue de Vaugirard, 75732 PARIS Cedex 15

www.agriculture.gouv.fr

Auprès de qui toute autre correspondance peut être adressée.