Liberté • Égalité • Fraternité
RÉPUBLIQUE FRANÇAISE

MINISTERE DE L'AGRICULTURE ET DE LA PECHE

Direction Générale de l'Alimentation Sous-direction de la Qualité et de la Protection des Végétaux **LNPV** **7, rue jean Dixméras** **49044 Angers cedex 01** Suivi par : Hélène SOUBELET Tél (/ Fax / Mail) : 02.41.36.83.38	**CIRCULAIRE** **DGAL/SDQPV/C2007-8012** **Date: 14 septembre 2007**

Date de mise en application : immédiate
Date limite de réponse:
Nombre d'annexe : 1
Confidentialité : tout public

Objet : Méthode officielle de détection de *Phytophthora alni par PCR* pour publication au B.O.

Résumé : Cette méthode s'applique à la détection de *Phytophthora alni* sur nécrose sous-corticale, sur racines, dans le sol et dans l'eau par la technique d'amplification par polymérisation en chaîne

Mots-clés : méthode de détection - *Phytophthora alni* – PCR -

Destinataires	
Pour exécution : Toutes DRAF Tous Laboratoires	Pour information :

Ministère de l'Agriculture et de la Pêche
Direction Générale de l'Alimentation
Sous-Direction de la Qualité et de la Protection des Végétaux

LNPV

Laboratoire

National de la

Protection des

Végétaux

Végétal : *Alnus* spp.

détection de : ***Phytophthora alni***

sur nécrose sous-corticale,

sur racines, dans le sol et dans l'eau

par la technique d'amplification

par polymérisation en chaîne

Réf. : Méthode MF / 07 / 20 version a

<u>Laboratoire de référence</u> :
LNPV Unité de Mycologie
Agricole et Forestière de Nancy
Domaine de Pixérécourt
54220 MALZEVILLE

Octobre 2005

Végétal : *Alnus* spp.

Détection de *Phytophthora alni* sur nécrose sous-corticale, sur racines, dans le sol et dans l'eau par la technique d'amplification par polymérisation en chaîne

SOMMAIRE

Introduction **2**
1. - Objet **2**
2. - Domaine d'application **2**
3. - Principe **2**
4. - Considérations d'ordre métrologique et assurance qualité **3**
5. - Appareillage **3**
5.1. - Matériel **3**
5.2. - Verrerie **4**
6. - Réactifs et produits **4**
7. - Consommables à usage unique **6**
7.1. - Consommables plastiques **6**
7.2. - Matériaux de broyage **6**
7.3. - Matériaux de filtration **6**
8. - Echantillonnage et échantillons **7**
8.1. - Définitions **7**
8.2. - Prélèvement sur une nécrose sous-corticale **7**
8.3. - Prélèvement sur appareil racinaire **7**
8.4. - Prélèvement dans du sol **7**
8.5. - Prélèvement dans un échantillon d'eau **8**
8.6. - Conservation et envoi des échantillons **8**
8.7. - Prise d'essai **8**
9. - Mode opératoire **8**
9.1. - Broyage de l'échantillon **8**
9.2. - Extraction et purification de l'ADN Total **9**
9.3. - Test de la solution d'ADN cible par PCR espèce spécifique **9**
9.4. - Séparation par électrophorèse et révélation des gels d'électrophorèse **12**
9.5. - Expression des résultats **13**
10. - Désinfection et destruction des déchets d'analyse **14**
11. - Références bibliographiques **14**

Annexe 15

Végétal : *Alnus* spp.

Détection de *Phytophthora alni* sur nécrose sous-corticale, sur racines, dans le sol et dans l'eau par la technique d'amplification par polymérisation en chaîne

Introduction

Phytophthora alni est un Oomycète de la famille des Pythiaceae. Il est homotallique et produit facilement des oogones et des anthéridies en culture artificielle. En revanche, les oospores produites restent stériles et ne germent pas. Il comprend trois sous-espèces, toutes pathogènes sur l'aulne : *P. alni* subsp. *alni*, *P. alni* subsp. *multiformis* et *P. alni* subsp. *uniformis*.
Phytophthora alni est un agent de dépérissement de l'aulne. Il provoque des nécroses sous-corticales et racinaires à progression très rapide. Un arbre atteint peut être tué en moins de trois années.
Il se propage vraisemblablement essentiellement par zoospores dans l'eau de rivière ou l'eau d'irrigation et par mycélium via des transports de terre. La gamme d'hôte de cet Oomycète connue à ce jour couvre exclusivement les arbres du genre *Alnus* (*Alnus glutinosa, Alnus viridis, Alnus cordata* et *Alnus incana*) et reste uniquement décrit en Europe *(*Gibbs *et al.,* 2003*).*

1. - Objet

L'objet de cette méthode est de détecter la présence des trois sous-espèces de *P. alni* dans un échantillon végétal (nécrose sous-corticale, racines) dans le sol (au pied d'aulne dépérissant ou substrat de pépinière) et dans l'eau (irrigation, rivière, plan d'eau)
Cette méthode est qualitative, elle permet de détecter *P. alni* 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 *P. alni* 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 *P. alni*.

2. - Domaine d'application

La méthode s'applique sur des nécroses sous corticales, des racines, du sol ou de l'eau.

3. - Principe

La méthode repose sur l'emploi de la technique de l'amplification par polymérisation en chaîne (Polymerase Chain Reaction : PCR®). L'utilisation d'amorces de PCR spécifiques de *P. alni* permet de détecter et d'amplifier une portion spécifique de l'ADN génomique de cet Oomycète. La détection s'effectue sur un extrait d'ADN total de l'échantillon prélevé.
La portion d'ADN détectée et amplifiée est située dans une zone inconnue et vraisemblablement non codante du génome de *P. alni*. Elle est détectée par l'utilisation de

marqueurs qui sont des amorces de PCR définies à partir de S.C.A.R. (Sequence Characterized Amplified Region). Elle a une taille attendue de 450 paires de bases.
Le produit de l'amplification est ensuite déposé pour migration sur un gel d'électrophorèse puis teinté au bromure d'éthidium. Le gel d'électrophorèse est ensuite exposé aux ultra-violets et la présence d'un fragment amplifié est vérifiée ainsi que sa taille estimée par comparaison à une échelle de marqueurs de poids moléculaires.

4. - Considérations d'ordre métrologique et assurance qualité

La technique de détection de régions cibles d'ADN d'un organisme par la technique de PCR autorise l'utilisation d'une série de contrôles permettant de valider la bonne qualité de la manipulation. Ces contrôles ont différentes fonctions (cf. § 9.3.1.) et leur utilisation permet de garantir que i) l'opérateur a correctement suivi le protocole, ii) les consommables utilisés étaient de qualité suffisante, iii) les volumes pipetés, les températures et durées de réaction, la concentration et le pH des solutions utilisés étaient corrects, iv) l'extrait d'ADN était analysable (pas d'interférence avec des composés inhibiteurs) et v) qu'il n'y a pas de contamination croisée des échantillons testés.
Ainsi, l'utilisation de ces témoins permet de s'affranchir de contrôles métrologiques classiques (volumes, pH, résistivité, température, certificats, etc.), l'interprétation des résultats obtenus avec les différents type de contrôles permet de valider ou non *a posteriori* l'ensemble du matériel, des consommables, de la manipulation et des résultats (cf § 9.5.1.).
En revanche, il est bien sûr recommandé d'effectuer un minimum de surveillance et de maintenance des appareils utilisés et de garantir un minimum de traçabilité des consommables utilisés pour pouvoir réagir en cas de problème ou de non validation de manipulation.

5. - Appareillage

5.1. - Matériel

- Autoclave à pression de vapeur
- Thermocycleur programmable
- Bain marie (cuve de 5 litres minimum)
- Bain marie ou bain à sec pour microtubes
- Réfrigérateur ou chambre froide
- Congélateur
- Transilluminateur à Ultra Violet (250 à 265 nm)
- Balance de précision (+- 10 mg) de portée adaptée (0.10 g à 100 g)
- Cuve à électrophorèse immergée horizontale
- Générateur de tension pour électrophorèses immergées (min 120 V)
- Centrifugeuse équipée d'un rotor à tubes de microcentrifugation, permettant d'obtenir une vitesse centrifuge variable entre 8000 et 14000 g).
- Système de production de glace pilée (recommandé)
- Agitateur oscillateur à plateau permettant l'agitation douce des bains de coloration des gels d'électrophorèse (facultatif)
- Jeu de micropipettes (gamme de 1µl à 1000 µl) pour l'extraction d'ADN total
- Jeu de micropipettes (gamme de 1µl à 1000 µl) pour la fabrication du mélange réactionnel de PCR et chargement des ADN extraits des échantillons à tester
- Micropipette (gamme de 10 à 20 µl) pour la manipulation d'ADN "post PCR", chargement des gels d'électrophorèse.
- Système de cuve pour coloration des gels d'électrophorèse au Bromure d'éthidium et rinçage des gels

- Agitateurs de type Vortex
- Broyeur de tissus avec adaptateur et portoirs pour tubes de 2 ml (de type TissueLyser-Qiagen ou équivalent)
- Système de filtration pour membrane de 47 mm de diamètre et pompe à vide correspondante (uniquement pour détection dans l'eau)
- Tamis de maille comprise entre 50 et 100 µm

Facultatif mais recommandé :

- Système de prise de vue sensible à la fluorescence (caméra CCD ou polaroïd) et de sauvegarde (sur fichier informatique)

- Hotte stérile pour préparation du mélange réactionnel et chargement des échantillons dans les tubes de PCR

5.2. - Verrerie

- Flacons autoclavables en verre borosilicaté de 100, 250 et 1000 ml.
- Béchers autoclavables

6. - Réactifs et produits

Les réactifs décrits ci dessous doivent être conservés et utilisés en suivant strictement les recommandations du fournisseur.

Eau osmosée :
Cette qualité d'eau est requise pour la fabrication des différents tampons. Elle doit présenter une résistivité proche de 1 MOhm.cm à 25°C.

Eau de qualité Ultra Pure :
L'Eau Ultra Pure (EUP) doit présenter une résistivité proche de 18 MOhm.cm à 25°C. L' EUP sera de préférence prélevée extemporanément.

Eau de Javel ou solution d'hypochlorite de Sodium (NaOCl) à 2° Cl [produit corrosif à manipuler avec précaution]

Kits d'extraction d'ADN :
L'ADN total des échantillons analysés (à la fois ADN végétal, ADN fongique, et éventuellement bactérien, viral etc.) est extrait et purifié à l'aide de mini kits d'extraction d'ADN de plantes disponibles dans le commerce. Le type de kit d'extraction choisi doit avoir démontré son efficacité par rapport à l'extraction classique au C.T.A.B. et purification au phénol-chloroforme (Henrion *et al.*, 1996 ; Ioos and Frey, 2000).

Oligonucléotides :

Séquence de l'amorce sens « **PA-F*** »:	5'- **GGT GAT CAG GGG AAT ATG TG** - 3'
Séquence de l'amorce antisens « **PA-R*** »:	5' - **ATG TCC GAG TGT TTC CCA AG** - 3'

* : Ioos *et al.*, 2005

Les solutions mères de chacune de ces amorces sont conservées congelés dans du tampon Tris EDTA (10 mM Tris, 1mM EDTA, pH 8) (="**TE**")à une concentration de 100 µM.

Des parties aliquotes de ces solutions mères sont diluées au 10ème dans de l'eau ultra pure (soit 10 µM). Ces parties aliquotes sont utilisés pour la préparation du mix réactionnel de PCR.

ADN polymérase thermostable :
Toutes les ADN polymérases thermostables sont utilisables pourvu qu'elles aient démontré leur efficacité et leur spécificité lors d'essais préliminaires effectués sur extraits d'ADN total de cultures pures référencées de *P. alni* et de *Phytophthora* spp, tel que décrit dans Ioos *et al.* (2005).
La polymérase à ADN doit être conservée au congélateur. La date de péremption doit être vérifiée avant utilisation.

Chlorure de Magnésium ($MgCl_2$) :
Ce dernier est fourni généralement par le fabricant avec l'ADN polymérase, en tube séparé ou directement en mélange dans le tampon de l'ADN polymérase.

Désoxyribonucléotines triphosphate (dNTPs) :
- 2'-deoxy-adenosine - 5'-triphosphate (dATP)
- 2'-deoxy-cytidine - 5'-triphosphate (dCTP)
- 2'-deoxy-guanosine - 5'-triphosphate (dGTP)
- 2'-deoxy-thymidine - 5'-triphosphate (dTTP)

Ces 4 désoxyribonucléiques triphosphates sont mélangés et conservés en solution équimolaire de 25mM pour chacun dans du Tris EDTA (pH 8, 0.5 M) : ="**dNTPs mix**" et conservés au congélateur

Bovine Serum Albumin (qualité biologie moléculaire):
Ce composé est livré sous forme de poudre. Il est reconstitué dans de l'eau ultrapure à raison de 10 mg/ml et stérilisé par filtration à travers une membrane de 0.2µm. Il peut être conservé sous forme liquide jusqu'à 6 mois au réfrigérateur.

Agarose :
L'agarose utilisé doit être spécialement conçu pour la fabrication de gels d'électrophorèse. Etant donné le poids moléculaire de la zone amplifiée (environ 450 paires de bases) ces derniers sont préparés à une concentration de 1 g d'agarose pour 100 ml de TBE 0.5X.

Marqueurs de poids moléculaire :
Il est recommandé d'utiliser une échelle de poids moléculaires comportant des fragments de tailles multiples de 100 paires de bases. Ceci permet d'estimer rapidement la taille des fragments amplifiés sur un gel et de la comparer à la taille attendue (ici 450 pb). Le mélange de marqueurs de poids moléculaire doit être préparé en suivant les préconisations du fournisseur.

Bromure d'éthidium :
Ce produit est dangereux par contact, inhalation et ingestion et a des propriétés mutagènes. Il faut donc le manipuler pur ou en dilution revêtu d'une blouse et en portant des gants adaptés. Il est obligatoire de récupérer tous les déchets contenant potentiellement du bromure d'éthidium (gels, bains de teinture, de rinçage, gants, papier filtre, etc.) et de les stocker dans un conditionnement étanche avant de le faire retraiter et décontaminer par une société spécialisée.
Ce produit fluoresce lorsqu'il est exposé aux UV et s'il est intercalé entre les paires de base de l'hélice d'ADN.
Il est recommandé de se le procurer conditionné sous forme de préparation liquide prête à l'emploi conditionné dans un compte gouttes. Il est ensuite utilisé dans le bain de coloration à une concentration voisine de 0.5µg / ml.

Lait écrémé en poudre :
Ce produit est à préparer en solution extemporanément. Il doit être utilisé à la concentration de 0.1 ± 0.01 g / 25 ml d'eau ultra pure.

Tampon de ADN polymérase :
Il est fortement recommandé d'utiliser le tampon de polymérase fourni avec cette dernière par le fabricant. En général, le tampon est fourni à une concentration 10 fois supérieure à sa concentration finale dans le mix réactionnel de PCR.

Tampon Tris Borate EDTA (TBE) : cf. annexe 1

Tampon de charge d'ADN amplifié : cf. annexe 1

Tampon Tris EDTA (pH 8): cf. annexe 1

Tampon Tris HCl (0.1 M, pH 8): cf. annexe 1

Feuilles de rhododendrons (détection de *P. alni* dans le sol uniquement) :
Ces feuilles seront cueillies sur des plants de rhododendron n'ayant pas été traités par des produits phytosanitaires ou au minimum pas depuis au moins 2 mois. La variété importe peu, mais il est préférable d'utiliser des rhododendrons à feuilles qui ne sont pas trop petites.

7. - Consommables à usage unique

7.1. - Consommables plastiques

- Microcônes stériles à filtre 1-10 µl
- Microcônes stériles à filtre 10-20 µl
- Microcônes stériles à filtre 20-100 µl
- Microcônes stériles à filtre 20-200 µl
- Microcônes stériles à filtre 100-1000 µl
- Microcônes stériles 1-10 µl
- Microcônes stériles 20-200 µl
- Microcônes stériles 100-1000 µl
- Microtubes de centrifugation stériles de 1.5 et 2ml
- Microtubes stériles pour PCR de volume adapté au puits du thermocycleur utilisé, à paroi fine, individuels, en barette de 8 ou en plaque de 96.

7.2. - Matériaux de broyage

Billes de broyage en carbure de tungstène de 3 mm de diamètre :
Avant utilisation, elles seront lavées au détergent puis abondamment rincées et égouttées. Elles sont ensuite stérilisées et séchées lentement au four pasteur (environ 2h à ±180°C).

7.3. - Matériaux de filtration

Membranes de filtration de 47 mm de diamètre et à pore de 5 µm. Les membranes de marque Millipore - type Durapore ® - ont démontré leur parfaite efficacité (Ioos *et al*., 2005). Toutefois, d'autres marques peuvent être utilisées, pourvu qu'elles aient démontré expérimentalement une égale efficacité.

8. - Echantillonnage et échantillons

8.1. - Définitions

- L'unité d'analyse est la portion de nécrose corticale, une portion d'appareil racinaire, un prélèvement de sol ou un prélèvement d'eau.
- Un échantillon correspond à un regroupement de plusieurs prélèvements ponctuels effectués à différents endroits dans la nécrose corticale, ou de plusieurs fragments de racines, ou d'un prélèvement dans un échantillon de sol, ou d'un maximum de 1 litre d'eau.

8.2. - Prélèvement sur une nécrose sous-corticale

La portion de nécrose corticale est découpée en petits fragments de taille inférieure à 1 cm^3 à l'aide d'un sécateur dont la lame a été préalablement stérilisée par flambage à l'alcool. La partie externe de l'écorce est écartée. Les morceaux sont ensuite redécoupés au scalpel stérile afin de mettre en évidence des limites de nécrose ou des tissus en voie de nécrose. Ces tissus seront prélevés et découpés au scalpel pour produire des petits cubes de 2-3 mm d'arête maximum. Les petits cubes sont ensuite transférés dans un microtube stérile de 2 ml à l'aide d'une pince stérile. Le volume de cubes de tissus ne doit pas dépasser un 1/4 du volume du tube, afin de ne pas baisser le rendement du broyage. L'échantillon conditionné en tube peut être conservé au congélateur jusqu'à extraction de l'ADN.
Si la taille de la nécrose sous-corticale le permet, il est recommandé de préparer deux sous échantillons (2 tubes) pour analyse.

8.3. - Prélèvement sur appareil racinaire

L'appareil racinaire est découpé en petits tronçons à l'aide d'un sécateur dont la lame a été préalablement stérilisée par flambage à l'alcool. Les tronçons sont ensuite redécoupés au scalpel stérile afin de mettre en évidence des limites de nécrose ou des tissus en voie de nécrose. Ces tissus seront prélevés et découpés au scalpel pour produire des petits morceaux de 2-3 mm de longueur maximum. Les petits morceaux sont ensuite transférés dans un microtube stérile de 2 ml à l'aide d'une pince stérile. Le volume de tissu racinaire ne doit pas dépasser un 1/4 du volume du tube, afin de ne pas baisser le rendement du broyage.
L'échantillon conditionné en tube peut être conservé à environ -20°C jusqu'à extraction de l'ADN.
Si la taille de l'appareil racinaire le permet, il est recommandé de préparer 2 sous échantillons (2 tubes) pour analyse.

8.4. - Prélèvement dans du sol

Note : L'analyse du sol repose sur le principe du piégeage biologique. Les zoospores de l'organisme recherché sont émises rapidement par les sporanges de *P. alni* dans le sol et vont parasiter préférentiellement des feuilles de rhododendron flottant sur une solution décantée de ce sol. Ces feuilles qui « piègent » le *P. alni* seront ensuite analysées par PCR.

Pour un échantillon de sol donné, un maximum de 500 ml de sol sera prélevé en homogénéisant la prise, puis placé dans un bac plastique. L'échantillon de sol sera recouvert de 2-3 cm d'eau stérile et 4 à 5 feuilles fraîches de rhododendron seront placées à la surface de l'eau, face inférieure en contact avec l'eau. Les feuilles de rhododendron auront été au préalable choisies pour ne présenter aucun symptôme de nécrose ni de décoloration et seront abondamment lavées à l'eau du robinet avant d'être séchées au papier absorbant et placées dans les pièges biologiques.

Les feuilles vont incuber en flottant pendant 48 à 72 heures et seront régulièrement examinées pour la présence de taches décolorées (plus facile à observer par transparence en l'exposant face à une source lumineuse). Les taches repérées seront découpées à l'aide d'un emporte pièce ou d'une lame de scalpel stérilisés, puis placés dans un microtube de 2 ml. Le tube ne doit pas être rempli de végétal au plus du quart de son volume ; passé ce volume, préparer un nouveau tube, qui constituera une prise d'essai supplémentaire.

8.5. - Prélèvement dans un échantillon d'eau

Le prélèvement sur un échantillon d'eau s'effectuera en agitant vigoureusement la solution reçue pendant quelques secondes et en sous échantillonnant un volume de 1 litre maximum. Le sous-échantillon sera ensuite pré-filtré à travers un tamis de maille comprise entre 50 et 100 µm et recueilli dans un bécher stérile. Le filtrat est ensuite filtré sur une membrane de 47 mm de diamètre et de 5µm de pore. La membrane est recueillie à l'aide d'une pince stérile et découpée à l'aide de ciseaux stériles en petits carrés de 4 mm2 maximum. L'ensemble des petits carrés est réparti équitablement dans deux tubes stériles de 2 ml.

8.6. - Conservation et envoi des échantillons

Les échantillons de végétal ou de sol peuvent être conservés quelques jours au réfrigérateur et pour le végétal jusqu'à 6 mois au congélateur avant envoi. Ce dernier devra s'effectuer par transport rapide à destination du laboratoire d'analyse. Les prélèvements pour analyse devront être effectués le jour de la réception. Dans le cas contraire, l'échantillon végétal reçu sera congelé jusqu'au prélèvement alors que les échantillons de sol ou d'eau seront conservés au froid.
Après prélèvement et conditionnement en tube, les sous échantillons peuvent être conservés dans leur tubes jusqu'à 6 mois au congélateur.

8.7. - Prise d'essai

Le microtube ou les deux microtubes de 2 millilitres contenant l'échantillon à analyser et prélevés comme énoncé plus haut constitue la prise d'essai.

9. - Mode opératoire

L'ensemble des opérations décrites dans le mode opératoire ci dessous doit s'effectuer en portant des gants en latex à usage unique. La paire de gants doit être systématiquement changée dès que la prise d'essai, à quelque stade du mode opératoire que ce soit, a été accidentellement mise en contact avec celle ci.

9.1. - Broyage de l'échantillon

L'objectif du broyage de la prise d'essai est de permettre de faciliter la libération d'un maximum d'ADN total lors de l'incubation de la prise d'essai dans le tampon de lyse.
Pour toute série d'extractions et quelle que soit la technique utilisée, un blanc d'extraction sera effectué. Une prise d'échantillon "vide" (="**Textr**") subira donc en parallèle toutes les phases de l'analyse pour vérifier l'absence de contamination lors de la phase d'extraction d'ADN (1er type de faux positif).

[a] Ouvrir chaque microtube contenant les échantillons et y ajouter 2 billes de carbure de tungstène préalablement refroidies au congélateur.

[b] Placer les microtubes dans le portoir à tube du broyeur de tissus. Les portoirs auront été préalablement refroidis au congélateur et sortis juste avant utilisation. Veiller à toujours équilibrer le système de broyage en répartissant symétriquement les tubes.
[c] Fixer fermement les portoirs au système d'agitation.
[d] Broyer 1.5 min à 30 Hz puis arrêter le broyage, enlever les portoirs, retourner les microtubes, les vortexer et recommencer un nouveau broyage de1.5 min à 30 Hz. Retirer les tubes de leur portoir de broyage et les placer dans un portoir de paillasse.

9.2. - Extraction et purification de l'ADN Total

[a] Ouvrir le microtube contenant la prise d'essai et y transférer 400 µl de tampon de lyse fourni par le fabricant pour une mini extraction d'ADN et 400 µl de solution de lait écrémé (0.1g /25 ml). Refermer le tube immédiatement
[b] Selon le type de kit d'extraction d'ADN utilisé, 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.
[c] Vortexer les tubes 5-10 secondes à l'endroit et à l'envers
[d] Incuber le microtube contenant la prise d'essai au bain marie ou au bain à sec à la température et pendant la durée préconisée par le fabricant de kits d'extraction (généralement 15 min à 65°C).
[e] Suivre ensuite le protocole d'extraction et de purification indiqué par le fabricant en y incluant obligatoirement au préalable une phase de centrifugation (4 min à 14000 g) permettant de culotter les débris cellulaires. Le surnageant est ainsi prélevé et transféré dans un nouveau microtube stérile. Le microtube contenant le culot cellulaire est jeté. Ne pas oublier au préalable de récupérer les billes de carbure de tungstène qui sont réutilisables.
[f] A la fin du mode opératoire prescrit par le fabricant, l'ADN total extrait est conservé sous forme de solution mère dans le tampon d'élution. Cette solution d'ADN total constituera la solution d'ADN directement analysée par PCR (= "**S-ADN cible**").
Toutefois, pour la détection de *P. alni* dans certains échantillons très « sales », il sera parfois nécessaire de diluer cette solution au 10ème ou au 100ème dans du tampon Tris EDTA (cf. résultats d'amplificabilité du TIA, § 9.3.1). En cas de non amplificabilité de la solution « S-ADN cible », « S-ADN cible /10ème » et « S-ADN cible /100ème » seront analysés.
[g] **S-ADN cible** est conservée au congélateur avant analyse.

9.3. - Test de la solution d'ADN cible par PCR espèce spécifique

9.3.1. - Dispositions particulières, contrôles

Pour toute série de test par PCR espèce –spécifique :

- **Un témoin positif d'amplification** sera introduit à cette étape. Une prise d'échantillon "**T+Pa**" correspondant à une solution de bactéries contenant un plasmide dans lequel a été inséré la zone cible (450 pb) des amorces de PCR PA-F et PA-R. La solution de T+Pa est conservée au congélateur à environ -20°C. Elle sera systématiquement testée conjointement aux prises d'essais lors de toute série de PCR. Il s'agit d'un contrôle positif permettant de vérifier que le mélange réactionnel a été correctement préparé et que les conditions d'amplification par PCR ont été respectées.

- **Le témoin négatif d'extraction** « **Textr** » sera testé dans la même réaction de PCR que les échantillons à tester. Il permettra de vérifier l'absence de contamination croisée lors de la phase d'extraction d'ADN. (1er type de faux positifs)

- **Un témoin négatif d'amplification** sera introduit à cette étape. Une prise d'échantillon "eau" (="**T-**") 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 cibles** dans les tubes individuels de PCR (2eme type de faux positifs).

- **Un témoin interne d'amplification (TIA) sera mélangé au mélange réactionnel dans les cas de tests PCR sur des extraits de sol.** Ce témoin correspondant à une solution de bactéries contenant un plasmide dans lequel a été inséré un fragment d'ADN sur lequel on a artificiellement greffé la zone cible des amorces de PCR PA-F et PA-R. Ce fragment est de taille supérieure à la taille de la cible chez *P. alni* (850 pb). Le TIA est préparé en parties aliquotes à une concentration de 3 bactéries / µl et conservé congelé[1].
  La présence de ce témoin dans le mix réactionnel permettra d'amplifier en parallèle un fragment de 850 pb lorsque les S-ADN cibles testées ne contenaient pas d'inhibiteurs. Il permet de mettre en évidence les échantillons qui ne seraient pas exploitables par PCR, à cause de la présence d'inhibiteurs dans l'extrait («= faux négatifs »). Attention, le TIA sera amplifié même pour le témoin négatif car il est ajouté directement dans le mélange réactionnel.

9.3.2. - Préparation du mélange réactionnel

La préparation du mélange réactionnel (="**mix**") s'effectuera de préférence dans une zone physiquement séparée de la zone où s'effectuent les électrophorèses d'ADN (présence potentielle de contaminants). Elle requiert en outre l'utilisation d'un jeu de micropipettes uniquement réservé à cet effet.

Le volume réactionnel individuel (="**Vreac**") choisi doit se situer entre 20 et 30 µl selon le type de thermocycleur et le type de tubes de PCR choisi.
Sa composition finale est la suivante :

Composé	Concentration finale dans Vreac
Eau Ultra Pure	qsp Vreac
Tampon de polymérase à ADN (10 X) fourni avec la polymérase à ADN	1 X
Bovine Serum Albumin (10mg/ml)	0.7µg /µl
Chlorure de Magnésium 25 mM	1 800 µM
Amorce sens "PA-F" (10µM)	0.45 µM
Amorce antisens "PA-R" (10µM)	0.45 µM
T.I.A. (±3 bact./µl)	±3 bactéries /20µl de Vreac
dNTPs mix 4 x 25mM	4 x 180 µM
Polymérase à ADN	0.66 U / 20µl de Vreac

Préparer un volume total de mix (="**Vmix**") suivant le calcul suivant :

Vmix = **Vreac** x (Nombre de prises d'essais testées simultanément +1 [=**Textr**] +1 [=**T+Pa**]+]+1 [=**T-**] +1 [=erreurs ou pertes de pipetage])

[1] Le TIA est disponible sur simple demande au LNPV – UMAF sous forme de suspension bactérienne dans de l'eau ultra-pure.

a) Le mix se prépare dans un microtube stérile de 1.5 ou 2 ml, de préférence conservé dans de la glace pilée.
b) Les différents composants, exceptée la polymérase à ADN sont mis à décongeler sur la paillasse à température ambiante puis de préférence conservés dans de la glace pilée lors de la préparation du mix. On veillera à vortexer vigoureusement le tampon de polymérase avant prélèvement.
c) Les différents composants sont ajoutés au microtube stérile à l'aide de micropipettes obligatoirement munies de microcônes stériles à embout filtre.
d) La polymérase à ADN est ajoutée en dernier dans le mix et doit toujours être conservée hors du congélateur dans la glace pilée.
e) Le microtube contenant le mix complet doit être passé au vortex pendant 10 secondes avant sa distribution. Le mix est de préférence conservé dans de la glace pilée avant sa distribution.

9.3.3. - Distribution du mix dans les microtubes de PCR

a) Le mix est distribué dans les microtubes de PCR individuels, en barettes ou en plaques correctement identifiés et de préférence placés dans de la glace pilée. Le volume distribué (="**Vdist**") est fonction du Vreac choisi : **Vdist = Vreac - (Vreac/10).** (soit 18 µl pour un **Vreac** de 20 µl)
b) **Vdist** est distribué dans chaque tube de PCR à l'aide une micropipette munie d'un microcône stérile.
c) Les tubes restent ouverts jusqu'à addition de la solution **S-ADN cible**

9.3.4. - Addition des solutions S-ADN cible dans les microtubes de PCR

a) Les différentes solutions S-ADN cibles correspondant aux différents prises d'essai à tester sont ajoutées une par une dans chaque tube de PCR à l'aide d'une micropipette munie de préférence d'un microcône stérile à embout filtre. Ne pas oublier de changer systématiquement de microcône stérile à embout filtre à chaque addition de solution S-ADN cible. Le volume de **S-ADN cible** (="**V-ADN cible**") est fonction du **Vreac** choisi : **V-ADN cible = Vreac/10** (soit 2 µl pour un **Vreac**=20 µl).
b) Les **S-ADN cibles** des différents témoins sont ajoutés : **Textr, et T+Pa**. Pour le **T-,** on substitue à la **S-ADN cible** un même volume d'eau ultra pure entrée dans la composition du mix.
c) Si le thermocycleur utilisé n'est pas équipé d'un couvercle chauffant, le **Vreac** est ensuite recouvert d'huile minérale stérile certifiée exempte de DNAase.
d) Les microtubes sont ensuite refermés de façon étanche et transférés dans le bloc du thermocycleur

9.3.5. - Paramètres de l' amplification par polymérisation en chaîne.

Les différents paramètres de la PCR espèce spécifique pour la détection de *P. alni* sont les suivants (Ioos *et al.,* 2005) :

Etape		Température de consigne	Durée programmée	Nombre de répétitions
1	Dénaturation initiale	95 °C	**- 3 min** pour une polymérase classique – **5-7 min** pour une polymérase liée à un anticorps (selon recommandation du	1

			fournisseur)	
2	Dénaturation	94°C	30 sec	35
	Hybridation	58°C	30 sec	
	Polymérisation d'ADN	72 °C	60 sec	
3	Elongation finale	72°C	10 min	1
4	Conservation (facultatif)	10°C	Jusqu'à intervention du manipulateur	-

A la fin de l'amplification par polymérisation en chaîne, les tubes de PCR sont conservés au réfrigérateur ou congelés jusqu'à leur dépôt sur gel d'électrophorèse.

9.4. - Séparation par électrophorèse et révélation des gels d'électrophorèse

Définition : à une prise d'essai ayant abouti à une solution d'ADN total (**S-ADN cible**) correspond un tube de PCR dans lequel a été généré un produit d'amplification ou "**amplifiat**" (le terme ne préjuge pas du fait qu'il y ait eu effectivement amplification ou non).

9.4.1. - Electrophorèse

Il est très fortement recommandé de manipuler les amplifiats (ouverture des tubes de PCR, dépôts sur gel et électrophorèses) dans une zone distincte du reste des manipulations (pièce séparée). Ceci permet de se prémunir un minimum des risques d'autocontamination (risques de faux positifs)

a) Préparer un gel d'agarose à 1% (ou équivalent) à l'aide de tampon TBE à 0.5 X (cf. Annexe I), prévoir une taille de gel et un type de peigne adaptés au nombre de tubes de PCR traités plus un pour le marqueur de poids moléculaire.
b) Facultatif mais recommandé : préparer un plan de gel sur lequel est indiqué l'emplacement de chaque amplifiat ainsi que l'emplacement des différents témoins et du marqueur de poids moléculaire.
c) Pour n tubes de PCR déposer n gouttes de 3 µl de tampon de charge dans n puits d'une plaque de microtitration
d) Prélever chaque amplifiat (8 µl) et le mélanger délicatement par aspiration refoulement avec le tampon de charge (*nota* : le tampon de charge peut être directement ajouté au produit d'amplification dans le tube de PCR au prorata du **Vreac)**.
e) Déposer délicatement l'amplifiat mélangé au tampon de charge dans le puits correspondant
f) Lorsque tous les amplifiats, les différents témoins et le marqueur de masse moléculaires sont déposés sur le gel, immerger délicatement le gel chargé dans la cuve d'électrophorèse, vérifier qu'il est suffisamment recouvert de tampon d'électrophorèse, sinon compléter. Mettre ensuite en marche le générateur de tension (4V / cm , pendant 1 heure)

9.4.2. - Révélation du gel d'électrophorèse

Il est très fortement recommandé de réserver une pièce spécifique pour la manipulation du bromure d'éthidium (coloration des gels, lavage des gels et exposition aux UV) et d'en contrôler l'accès aux seules personnes autorisées.

a) Après l'électrophorèse, le gel est incubé 15 min dans une cuve contenant de l'eau additionnée de bromure d'éthidium à la concentration de 0.5 µg/ml. La cuve est disposée sur un agitateur à bascule (facultatif)
b) Le gel est ensuite placé 1 min dans une cuve de "lavage" contenant de l'eau du robinet ou du TBE 0.5X puis déposé sur un transilluminateur à UV (250 à 300 nm) en veillant à ne pas exposer le manipulateur au rayonnement (port un casque à visière filtrante ou utilisation d'une planche filtrante à déposer sur le transilluminateur
c) Il est conseillé d'effectuer une prise de vue du gel exposé aux UV et d'utiliser cette prise de vue (impression ou fichier informatique) pour analyser les résultats.

9.5. - Expression des résultats

9.5.1. - Validation de l'analyse

La validation de l'analyse s'effectue en observant les résultats des amplifiats générés à partir des différents témoins.
L'analyse est considérée validée si et seulement si l'ensemble des conditions suivantes sont réunies :

1) Le **T-** ne présente aucun fragment amplifié de 450 pb visible => il n'y a pas eu de contamination accidentelle pendant la préparation du mix et l'ajout des **S-ADN cibles**.
2) Le **T+Pa** présente un fragment amplifié visible et de taille attendue (environ 450 paires de bases) => les conditions de PCR et la composition du mix de PCR ont permis d'amplifier spécifiquement et avec un rendement suffisant la séquence cible chez *P. alni*.
3) Le **Text** ne présente aucun fragment amplifié de 450 pb visible => il n'y a pas eu de contamination accidentelle pendant la phase d'extraction et de purification d'ADN jusqu'à l'obtention des **S-ADN cibles**.
4) il faut vérifier pour chaque prise d'essai que si aucun fragment amplifié de 450 pb n'est visible, l'amplification du TIA (850 pb) a bien eu lieu. Dans le cas contraire, il y a eu inhibition de la PCR et il faut refaire le test sur une S ADN cible diluée.
   note : il est possible que possible que pour le T+Pa et pour certaines S ADN cibles, la présence de séquences cible de *P. alni* en bonne quantité dans l'extrait rendent impossible l'amplification du TIA (compétition entre deux fragments, et non amplification du plus grand). Toutefois, la présence de l'amplifiat de la cible ne laisse pas de doute quant à l'absence d'inhibiteur.

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

9.5.2. - Lecture des résultats

Si l'analyse est validée conformément au § 861, les résultats peuvent être considérés comme interprétables pour l'ensemble des **S-ADN cibles**, donc des prises d'essai, testés au cours de la même PCR.

- Si pour une **S-ADN cible** testée, un fragment amplifié est visible et qu'il a la taille attendue (environ 450 pb), la prise d'essai est dite positive pour *P. alni*.
  Le résultat sera alors exprimé par une phrase du type " ***P. alni* détecté dans l'échantillon analysé par PCR espèce-spécifique**".

- Si pour une **S-ADN cible** testée, aucun fragment amplifié n'est visible ou qu'il n'a pas la taille attendue, la prise d'essai est dite négative pour *P. alni.*

Le résultat sera alors exprimé par une phrase du type " ***P. alni*** **non détecté dans l'échantillon analysé par PCR espèce-spécifique**.

10. - Désinfection et destruction des déchets d'analyse

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 d'oomycète viable à ce stade)

Les tubes et autres consommables plastiques ayant été utilisés lors de la phase de préparation du mix et chargement des S-ADN cible peuvent être éliminés sans traitement particulier.

Les consommables plastiques ayant été utilisés ou manipulé en phase post-PCR (microcônes pour sur gel dépôt des amplifiats et microtubes de PCR) sont regroupés dans une poubelle de paillasse spécifique qui sera régulièrement autoclavée avant élimination dans les déchets classiques.

Les consommables ayant été en contact avec le bromure d'éthidium (gants, gels, papier filtre) seront recueillis dans un container étanche spécialement réservé à cet effet. Le retraitement de ces déchets sera confié à une entreprise spécialisée. Les bains de coloration et de lavage des gels seront traités par ajout d'une dose de charbon actif (100 mg de charbon actif pour 100 ml de solution. Après une nuit de fixation, la solution est filtrée sur papier filtre plissé (qualité de type Whatman® n°1) et le filtrat est éliminé dans le réseau d'eau usée classique (d'après Sambrook *et al*., 1989). Le filtre ainsi que son contenu est recueilli dans le container étanche décrit plus haut.

11. - Références bibliographiques

Gibbs, J., Van Dijk, C., and Webber J. (2003) Phytophthora disease of alder in Europe. Forestry commission Bulletin 126, Edinburgh, 82 pp

Henrion B, Chevalier G and Martin F (1994) Typing truffle species by PCR, amplification of the ribosomal DNA spacers. *Mycological Research* 98: 37-43

Ioos R. and Frey P. (2000) Genomic Variation within *Monilinia laxa*, *M. fructigena* and *M. fructicola*, and application to species identification by PCR. *European Journal of Plant Pathology* 106 (4) : 373-378

Ioos R., Husson C., Andrieux A. and Frey P. (2005) SCAR-based PCR primers to detect the hybrid pathogen *Phytophthora alni* and its subspecies causing alder disease in Europe. *European Journal of Plant Pathology* 112: 323-335.

Sambrook J, Fritsch E. and Maniatis T. (1989) Molecular Cloning, a Laboratory Manual. Cold spring Harbor Laboratory Press. New York.

OOo

Le Sous Directeur de la Qualité
Et de la Protection des Végétaux

Joël MATHURIN

ANNEXE 1 : COMPOSITION DES DIFERENTS TAMPONS

Tris Borate EDTA (TBE) :

Il est recommandé de se procurer cette solution tampon toute prête à la concentration 10 X. Le TBE est ensuite dilué dans de l'eau osmosée à 0.5 X pour son utilisation pour la préparation des gels d'électrophorèse et du tampon d'électrophorèse.

Il est toutefois envisageable de le fabriquer soit même en l'autoclavant avant emploi.

Composition du TBE 5X :

- Tris [hydroxyméthyl] aminométhane : 450 mM
- Acide borique : 450mM
- EDTA (Ethylène Diamine Tétracetate disodium salt) en solution de 0.5 M, pH8 : 10 mM

Tampon de charge d'ADN amplifié :

Un microlitre de tampon de charge est systématiquement mélangé à dix microlitres du produit d'amplification avant dépôt sur le gel d'électrophorèse. Selon le volume que l'on choisit de déposer dans le puit, adapter les chiffres donnés en respectant les mêmes proportions.

La composition de ce tampon est la suivante pour :
- Bleu de Bromophénol : 0.25 % (Poids/volume)
- Xylène cyanol : 0.25 % (Poids/volume)
- Saccharose en solution dans du TBE 0.5 X : 40 % (Poids/volume)

Tampon Tris EDTA (pH 8):

Le tampon Tris EDTA (10 mM Tris HCl, pH 8, 1mM EDTA pH 8) se compose comme suit :
- 10mM Tris HCl, pH 8
- 1 mM EDTA, pH 8

Tampon Tris HCl (0.1 M, pH 8):

Pour 100 ml :
a) Préparer 1.21 g de Tris
b) Ajouter 80 ml d'Eau Ultra Pure
c) Ajuster le pH à 8 en ajoutant goutte à goutte HCl à 25%
d) Compléter qsp 100 ml d'Eau Ultra Pure