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 (Réf. Interne / Classement)	**CIRCULAIRE** **DGAL/SDQPV/C2007-8013** **Date: 12 juillet 2007**

Date de mise en application : immédiate

Date limite de réponse:

Nombre d'annexes : 2

Confidentialité : tout public

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

Résumé : Cette méthode s'applique à la détection *in planta* et à l' identification en culture pure de : *Phytophthora ramorum* Werres, De Cock & Man in't Veld par la technique d'amplification par polymérisation en chaîne

Mots-clés : Mycologie - Méthode de détection - identification - *Phytophtora ramorum* - PCR

Destinataires	
Pour exécution : Toutes DRAF Tous Laboratoires	Pour information :

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

LNPV

Laboratoire

National de la

Protection des

Végétaux

Détection *in planta* et identification en culture pure de :
Phytophthora ramorum Werres, De Cock & Man in't Veld

par la technique d'amplification par polymérisation en chaîne

Réf. : MF/07/23 version a

<u>Laboratoire de référence</u> :
LNPV Unité de Mycologie
Agricole et Forestière de Nancy
Domaine de Pixérécourt–BP 90059
54220 MALZEVILLE

Fevrier 2007

Détection *in planta* et identification en culture pure de : *Phytophthora ramorum* Werres, De Cock & Man in't Veld par la technique d'amplification par polymérisation en chaîne

SOMMAIRE

Introduction 2

1- Objet 2

2-Domaine d'application 2

3-Principe 3

4- Considérations d'ordre métrologique et assurance qualité 3

5- Appareillage 4

51- Matériel 4

52- Verrerie 4

6- Réactifs et produits 5

7 - Consommables à usage unique 7

71- Consommables plastiques 7

72- Consommables pour le broyage 7

8 - Echantillonnage et échantillons 7

81 – Prélèvement des échantillons 7

82 - Prélèvement des sous-échantillons : prises d'essai 8

83 - Conservation des échantillons 8

84 – Précautions à prendre lors de la prise d'essai 8

9 - Mode opératoire 9

91 - Broyage de l'échantillon pour détection *in planta* 9

92 - Extraction et purification de l'ADN Total 9

921- Extraction d'ADN à partir de tissu végétal potentiellement infecté 9

922- Extraction d'ADN à partir de culture pure d'oomycète 10

93 - Test de la solution d'ADN cible par PCR « TRP-PRAM-F/R » 10

931- Dispositions particulières 10

932- Préparation du mélange réactionnel TRP-PRAM-F/R 11

933 Distribution du mix dans les microtubes de PCR 12

934 Addition des solutions S-ADN cible dans les microtubes de PCR 12

935- Paramètres de l' amplification par polymérisation en chaîne. 12

936- Séparation par électrophorèse et révélation des gels d'électrophorèse 13

9361- Electrophorèse 13

9362- Révélation du gel d'électrophorèse 14

937- Expression des résultats 14

9371- Validation de l'analyse 14

9372- Lecture des résultats 15

94 - Test de la solution d'ADN cible par PCR « GPA-PRAM-F/R » 15

931- Dispositions particulières 15

942- Préparation du mélange réactionnel GPA-PRAM-F/R 16

943 Distribution du mix dans les microtubes de PCR 16

944 Addition des solutions S-ADN cible dans les microtubes de PCR 16

945- Paramètres de l' amplification par polymérisation en chaîne. 16

946- Séparation par électrophorèse et révélation des gels d'électrophorèse 17

947- Expression des résultats 17

9471- Validation de l'analyse 17

9472- Lecture des résultats 17

10 - Désinfection et destruction des déchets d'analyse 18

11 - Références bibliographiques 18

INTRODUCTION

L'agent phytopathogène concerné est *Phytophthora ramorum*, oomycète agent de la mort brutale du chêne (sudden oak death).

1- OBJET

Conformément à la décision du 19 septembre 2002 (2002/757/CE) relative aux mesures d'urgence phytosanitaires provisoires pour prévenir l'introduction et la dissémination au sein de l'union européenne de *Phytophthora ramorum*, révisée en avril 2004 (2004/426/CE), ce dernier est considéré comme organisme réglementé.
L'objet de cette méthode est de détecter la présence de *P. ramorum* dans un échantillon prélevé sur plante hôte ou de confirmer l'identité d'un oomycète isolé en culture pure. La présence de *P . ramorum* est mise en évidence par deux tests PCR[1] (Polymerase Chain Reaction) consécutifs qui ciblent des *loci* différents et indépendants dans le génome de l'oomycète.

Cette méthode est qualitative, elle permet de détecter *P. ramorum* 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 en première analyse sont considérés comme indemnes de *P. ramorum* ou contaminé à un niveau trop faible pour être mis en évidence par la technique utilisée.
Un échantillon pour lequel une réponse positive est obtenue par le premier test de détection est analysé par un second test PCR. Si une deuxième réponse positive est obtenue, l'échantillon est considéré comme contaminé par *P. ramorum*.

La méthode présentée 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. Elle peut constituer une méthode alternative à la méthode ML/XX « détection de *Phytophthora ramorum* sur feuilles, rameaux, bourgeons et troncs par isolement. »

Phytophthora ramorum a un statut de parasite réglementé, c'est à dire qu'il doit être manipulé dans de strictes conditions de quarantaine en accord avec la directive 95/44/CE. Bien qu'il ne figure pas sur les listes de la directive 2000/29/CE, l'exigence pour la manipulation et le confinement de cet agent pathogène à dissémination aérienne doit être de type NS3.

2-DOMAINE D'APPLICATION

La méthode permet de détecter *Phytophthora ramorum* sur les feuilles, rameaux et troncs de diverses espèces végétales*. Elle permet aussi de confirmer l'identification de *P. ramorum* isolé en culture pure.

[1] Le brevet de la technique PCR est détenu par la société Hoffmann – La Roche

* Une liste officielle d'espèces végétales sensibles à *Phytophthora ramorum* a été établie par la Commission européenne (Décision communautaire 2002/757/CE du 19 septembre 2002, modifiée par la Décision 2004/426/CE du 29 avril 2004). Une liste nationale de végétaux à surveiller en priorité est régulièrement publiée par le biais d'une Note de service (DGAL-SDQPV). Ces listes sont très évolutives et non exhaustives, les espèces végétales susceptibles d'être analysées sont donc nombreuses et variées (arbres, arbustes, feuillus, conifères…).
Les essences les plus fréquemment contaminées par *Phytophthora ramorum* en Europe sont *Rhododendron* spp., *Viburnum* spp. et, dans une moindre mesure, *Camellia* spp.

3-PRINCIPE

La méthode repose sur l'emploi de la technique de l'amplification par polymérisation en chaîne (PCR). L'utilisation de deux couples d'amorces de PCR spécifiques de *Phytophthora ramorum* permet de détecter et d'amplifier pour chacun d'entre-eux une portion spécifique de l'ADN génomique de cet oomycète. La détection s'effectue sur un extrait d'ADN total du tissu végétal suspecté d'être infecté ou de la culture pure sur milieu gélosé.
1. Premier test PCR :
La portion d'ADN détectée et amplifiée est située au niveau du gène nucléaire TRP1 (Ioos *et al*., 2006). Elle est présente en simple copie dans le génome.
2. Second test PCR (test de confirmation):
La portion d'ADN détectée et amplifiée est située au niveau du gène nucléaire GPA (Ioos *et al*., 2006). Elle est présente en simple copie dans le génome.
Les produits d'amplification sont ensuite déposés pour migration sur un gel d'électrophorèse qui est teinté au bromure d'éthidium. Le gel d'électrophorèse est ensuite exposé aux ultra-violets et la présence des fragments amplifiés est vérifiée ainsi que leur taille estimée par comparaison à une échelle de marqueurs de taille moléculaires.

Pour une vision globale du protocole, cf. le diagramme décisionnel en Annexe 1.

4- CONSIDERATIONS D'ORDRE METROLOGIQUE ET ASSURANCE QUALITE

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. § 931) 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 prélevés par micropipettes, les températures et durées de réaction, la concentration et le pH des solutions utilisées étaient corrects, iv) l'extrait d'ADN était analysable (pas d'interférence avec des composés inhibiteurs) et v) qu'il n'y a pas eu 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 types de contrôles permet de valider ou non a posteriori l'ensemble du matériel, des consommables, de la manipulation et des résultats. En revanche, il est 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.

Les contrôles utilisés dans cette méthode sont en majorité des cibles d'ADN clonées dans des plasmides bactériens. Ils sont réputés parfaitement stables dans le temps s'ils sont conservés congelés. La manipulation et la conservation de ces organismes génétiquement modifiés est toutefois soumise à agrément par la Commission du Génie Génétique.

5- APPAREILLAGE

51- Matériel

- Autoclave à pression de vapeur
- Thermocycleur programmable
- Bain marie ou bain à sec pour microtubes de 2 ml
- Réfrigérateur ou chambre froide
- Congélateur (température maximale –15°C)
- Transilluminateur à Ultra Violet (250 à 265 nm)
- Balance de précision (± 1 g) de portée adaptée (1 g à 100 g)
- Cuve à électrophorèse immergée horizontale
- Générateur de tension pour électrophorèses immergées (min 120 V)
- Centrifugeuse équipée d'un rotor à microtubes de 2 ml, permettant d'obtenir une vitesse centrifuge variable entre 8000 et 14000 g).
- Jeu de micropipettes (gamme de 10 µl à 1000 µl) pour l'extraction d'ADN total
- Jeu de micropipettes (gamme de 10 µl à 1000 µl) pour la fabrication du mix réactionnel de PCR et chargement des ADN totaux 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)

Facultatif :

- Système de production de glace pilée.
- Système de prise de vue sensible à la fluorescence (caméra CCD ou polaroïd) et de sauvegarde (sur fichier informatique)
- Hotte à flux laminaire stérile pour préparation du mix réactionnel et chargement des échantillons dans les tubes de PCR (recommandé)

52- Verrerie

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

6- REACTIFS ET PRODUITS

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

Eau osmosée ou distillée :
Cette qualité d'eau est requise pour la fabrication des différents tampons. L'eau doit être de qualité compatible avec les méthodes utilisées (absence d'activité nucléasique, absence d'effet inhibiteur de PCR et absence d'acide nucléique détectable).

Eau de qualité Ultra Pure :
L'Eau Ultra Pure (EUP) doit présenter une qualité suffisante pour son utilisation en biologie moléculaire (exempte de DNase et d'acides nucléiques cibles amplifiables).

Eau de Javel ou solution d'hypochlorite de Sodium (NaOCl) titrant au moins 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 peut être celui décrit dans Ioos *et al*. (2006) ou 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 :

PCR de première détection

Séquence de l'amorce sens « **TRP-PRAM-F*** »:	5'- gag tag aaa ctt cgg gaa tg -3'
Séquence de l'amorce antisens « **TRP-PRAM-R*** »:	5'- gtt cgg cac att aac gca g -3'

* : Ioos *et al*., 2006

PCR de confirmation

Séquence de l'amorce sens « **GPA-PRAM-F*** »:	5'- taa gga aca agg tac caa ag -3'
Séquence de l'amorce antisens « **GPA-PRAM-R*** »:	5'- ctc agg aat tca ctc tca cg -3'

* : Ioos *et al*., 2006

Les solutions mères de chacune de ces amorces sont conservées au congélateur 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 utilisées pour la préparation du mix réactionnel de PCR.

ADN polymérase thermostable :
Il est souhaitable d'utiliser la polymérase à ADN décrite dans Ioos *et al.* (2006) mais 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 d'isolats référencés de *P. ramorum,* dans les conditions d'utilisation décrites par la présente méthode.

La polymérase à ADN doit être conservée congelée. 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.

Désoxyribonucléiques 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**"

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 0.2 µm. 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 des régions amplifiées (entre 250 et 800 paires de bases) ces derniers sont préparés à une concentration d’environ 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 527 et 248 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 proche de 0.5 µg / ml.

Polyvinylpolypyrrolidone (PVPP) :
Ce produit est à utilisé sous forme de poudre.

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) :
Il existe des solutions commerciales prêtes à l'emploi, ou à fabriquer à façon cf. annexe 2

Tampon de charge d'ADN amplifié :
Il existe des solutions commerciales prêtes à l'emploi, ou à fabriquer à façon cf. annexe 2

Tampon Tris EDTA (pH 8):
Il existe des solutions commerciales prêtes à l'emploi, ou à fabriquer à façon cf. annexe 2

Tampon Tris HCl (0.1 M, pH 8): cf. annexe 1
Il existe des solutions commerciales prêtes à l'emploi, ou à fabriquer à façon cf. annexe 2

7 - CONSOMMABLES A USAGE UNIQUE

71- 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 stériles de 1.5 et 2 ml
- 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.

72- Consommables pour le broyage

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

8 - ECHANTILLONNAGE ET ECHANTILLONS

81 – Prélèvement des échantillons

Symptômes sur rameaux et feuilles : couper au sécateur la partie atteinte en incluant les limites de nécrose. Désinfecter les outils après chaque prélèvement.

Symptômes sur tronc et branches : prélever au ciseau à bois un morceau d'écorce et le bois attenant incluant la limite de la nécrose sous corticale ; taille de l'échantillon 10 X 10 X 3 cm minimum.
Envelopper l'échantillon dans du papier journal puis dans un sac plastique fermé hermétiquement. Désinfecter les outils après chaque prélèvement.

Exploiter de préférence l'échantillon dès son arrivée au laboratoire. Cependant son analyse peut être reportée de quelques jours (7 maximum) s'il est conservé au réfrigérateur à 5°C±3°C.

Si l'échantillon est sale (terre, mousse…) le nettoyer par rinçage ou éventuellement brossage dans de l'eau, en prenant soin de ne pas endommager les parties intéressantes (l'eau sera récupérée et stérilisée en même temps que la verrerie). Laisser sécher ensuite à l'air libre sur du papier absorbant.

82 - Prélèvement des sous-échantillons : prises d'essai

821- Prélèvement sur un chancre ou sur une nécrose sur rameau, bourgeon ou feuille.
Sur un échantillon présentant un de ces symptômes, de fines lamelles de la zone atteinte (autour de 2-3 mm dans les trois dimensions pour chacune d'entre elles) seront prélevées à l'aide d'une lame de scalpel stérile et placées dans un microtube plastique stérile de 2 ml qu'on refermera immédiatement. Prélever uniquement dans la zone du chancre ou en limite de la zone nécrosée.
Pour un chancre ou une tache donnés, un volume maximum de 300-400 µl sera prélevé, ce qui constituera la prise d'essai. Il faut impérativement éviter de remplir le tube au plus du quart de son volume car ceci rendrait son analyse impossible.

822- Prélèvement sur une culture pure
Le prélèvement doit s'effectuer sur une culture d'oomycète de moins de 15 jours. Sur une culture pure d'oomycète, une fine lamelle de culture (environ 5 x 10 mm en surface, pour environ 1 mm en profondeur) est prélevé à l'aide d'une lame de scalpel ou d'une pointe stérile. La récolte est placée dans un tube PCR contenant environ 100 µl de Tris EDTA et qu'on refermera immédiatement. Ceci constituera la prise d'essai.

83 - Conservation des échantillons

Les prises d'essai peuvent être conservées jusqu'à 6 mois au congélateur avant analyse. Après extraction d'ADN les extraits peuvent être conservés congelés pendant 1 an sous réserve qu'ils ne soient pas décongelés puis recongelés plusieurs fois.

84 – Précautions à prendre lors de la prise d'essai

Pour chaque nouveau prélèvement, une nouvelle paire de gants ainsi qu'une nouvelle lame de scalpel devront être utilisées. Il est fortement conseillé d'utiliser des scalpels stériles jetables conditionnés sous blister. Un même scalpel peut être utilisé sous réserve i) de le désinfecter par flambage à l'alcool ou ii) de le désinfecter par trempage quelques secondes dans une solution d'eau de javel à environ 5° chlorométriques suivi d'un rinçage à l'eau stérile.
Le test de détection utilisant une technique d'amplification spécifique d'ADN, l'alcool seul n'est d'aucun usage car s'il a un effet biocide limité, il ne déstructure pas du tout l'ADN de

l’oomycète. Seule l’hypochlorite de Sodium (eau de javel) à une concentration suffisante permet de détruire l’ADN.

9 - MODE OPERATOIRE

L'ensemble des opérations décrites dans le mode opératoire doit s'effectuer en portant des gants 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.

91 - Broyage de l'échantillon pour détection *in planta*

L'objectif du broyage du sous-échantillon est de permettre d’homogénéiser ce dernier et de faciliter la libération d'un maximum d'ADN total lors de l'incubation de la prise d'essai dans le tampon de lyse.

a) Prélever deux billes de broyage.
b) Ouvrir le microtube contenant la prise d'essai et y transférer les billes
c) Prélever à l'aide d'une micropipette l'intégralité du volume de tampon de lyse préconisé par le fabricant pour une mini extraction d'ADN. Le tampon de lyse est fourni avec le kit d'extraction. Transférer le tampon de lyse dans le tube. 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. Ajouter environ 2 à 3 mg de PVPP en poudre.
d) Refermer le tube de façon parfaitement étanche. Retourner en l'agitant plusieurs fois le microtube.
e) Placer le microtube sur le portoir du broyeur et broyer environ 2 minutes à une fréquence d’agitation d’environ 30 Hz.
f) Pendant la phase de broyage, arrêter à au moins une reprise l'agitation et retourner en l'agitant ou vortexant plusieurs fois le microtube.

Pour toute série d'extractions, un blanc d'extraction sera effectué. Une prise d'échantillon "vide" (= "**Textr**") subira donc 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). Il est possible de remplacer cet échantillon vide par un extrait d’ADN prêt à l’emploi ne présentant aucun risque d’amplification croisée avec les tests de PCR décrits ci après (témoin négatif de processus, **T-proc**).

92 - Extraction et purification de l'ADN Total

921- Extraction d’ADN à partir de tissu végétal potentiellement infecté

[a] Le microtube contenant la prise d'essai broyée est incubé au bain marie ou au bain à sec pendant environ 10 min ± 2 min à la température préconisée par le fabricant de kits d'extraction (généralement autour de 65°C ±3°C).

[b] Suivre ensuite le protocole d'extraction et de purification indiqué par le fabricant en y incluant obligatoirement au préalable une phase de centrifugation (3-4 min à une vitesse de rotation permettant d'obtenir une accélération de 10 à 14 000 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.
[c] A la fin du mode opératoire prescrit par le fabricant, l'ADN total extrait est élué dans un volume final autour de 100 µl de tampon d'élution. Cette solution d'ADN total constituera la solution d'ADN directement analysée par PCR (= "**S-ADN cible**"). Toutefois, pour anticiper la présence d'effet inhibiteur dans S-ADN cible, il est possible de diluer cette solution au 10ème dans le tampon d'élution ou équivalent. La solution « S-ADN cible » sera analysée ainsi que l'éventuelle « S-ADN cible /10ème ».
[d] S-ADN cible et S-ADN cible /10ème sont conservées au congélateur avant analyse.

922- Extraction d'ADN à partir de culture pure d'oomycète

[a] Le microtube de PCR contenant la lamelle de culture pure dans le Tris EDTA est chauffé dans le bloc du thermocycleur à une température entre 95 et 99 °C pendant environ 3 à 4 min, puis immédiatement incubé dans de la glace pilée pendant 2 minutes.
[b] Refaire une fois le point [a]
[c] Ces cycles de chauffage/refroidissement permettent de libérer une quantité suffisante d'ADN total dans le tampon Tris EDTA pour être testé par PCR. Cette solution d'ADN total constituera la solution d'ADN directement analysée par PCR (= "**S-ADN cible**").

93 - Test de la solution d'ADN cible par PCR « TRP-PRAM-F/R »

931- Dispositions particulières

Pour toute série de test par PCR « TRP-PRAM-F/R » :

[a] **Un contrôle positif d'amplification** sera systématiquement introduit à cette étape. Une prise d'échantillon "**T+TRP-Pr**" correspondant i) à un extrait d'ADN génomique d'un isolat référencé de *P. ramorum* ou ii) à une solution de bactéries contenant un plasmide dans lequel a été inséré la zone cible (527 pb) des amorces de PCR TRP-PRAM-F et TRP-PRAM-R. La solution de T+TRP-Pr est conservée au congélateur. Ce contrôle sera systématiquement testé 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.
[b] **Un contrôle de limite pratique de détection ('T LOD')** peut être facultativement introduit à cette étape. Il permet de vérifier que la réaction PCR s'est effectué de façon optimale (conditions thermodynamique et chimique) pour que la plus petite quantité détectable de *P. ramorum* puisse avoir été détectée dans un échantillon.
[c] **Un contrôle négatif d'amplification** ('**T-**') sera systématiquement introduit à cette étape. Une prise d'échantillon "eau" subira donc toutes les phases de l'analyse à partir de la préparation du mélange réactionnel de PCR pour vérifier l'absence de contamination lors de cette phase et lors du chargement des **S-ADN cibles** dans les tubes individuels de PCR (2eme type de faux positifs).

[d] **Le contrôle négatif d'extraction ('Textr')** sera introduit à cette étape pour vérifier l'absence de contamination croisée entre échantillons ou de contamination externe lors de la phase d'extraction d'ADN.
[e] **Le contrôle négatif de processus ('T-proc')** sera introduit à cette étape s'il a été utilisé lors de l'extraction. Il représente un extrait d'ADN exogène prêt à l'emploi ne présentant aucun risque d'amplification croisée avec le test de PCR TRP-PRAM-F/R et qui peut faciliter la co-extraction d'ADN cible lorsque ce dernier est présent à une très faible quantité.
[f] **Un témoin interne d'amplification (TIA) sera mélangé au mélange réactionnel.** 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 TRP-PRAM-F/R. Ce fragment est de taille supérieure à la taille de la cible chez *P. ramorum* (ca 720 pb). Le TIA est préparé en parties aliquotes à une concentration de 2.5 UFC / µl et conservé au congélateur[2].
La présence de ce témoin dans le mix réactionnel permettra d'amplifier en parallèle un fragment de ca 720 pb lorsque les S-ADN cibles testées ne contenaient pas suffisamment 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.

932- Préparation du mélange réactionnel TRP-PRAM-F/R

La préparation du mélange réactionnel (="**mix**") s'effectuera de préférence dans une zone physiquement séparée de la zone où s'est effectuée l'extraction et la purification de l'ADN total. 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.

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 (10 mg/ml)	0.6 µg /µl
Chlorure de Magnésium 25 mM	2 mM
Amorce sens "TRP-PRAM-F" (10 µM)	0.45 µM
Amorce antisens "TRP-PRAM-R" (10 µM)	0.45 µM
T.I.A. (2.5 UFC./µl)	5 UFC /20 µl de Vreac
dNTPs mix 4 x 25 mM	4 x 200 µM
Polymérase à ADN	0.5 U / 20 µl de Vreac

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

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

Vmix = **Vreac** x (Nombre de prises d'essais testées simultanément + nombre de tubes 'contrôle' +1 [=erreurs ou pertes de pipetage])

a) Le mix se prépare dans un microtube stérile de 1.5 ou 2 ml, 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 homogénéisés par vortexage. Il sont ensuite conservés dans de la glace pilée lors de la préparation du mix.
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 manipulée 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 conservé dans de la glace pilée avant sa distribution.

933 Distribution du mix dans les microtubes de PCR

a) Le mix est distribué dans les microtubes de PCR individuels ou en barettes correctement
identifiés et 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 obligatoirement d'un microcône stérile à embout filtre.
c) Les tubes restent ouverts jusqu'à addition de l'extrait d'ADN à tester.

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

a) Les différentes solutions S-ADN cible et le cas échéant les S-ADN cible 1/10ème 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 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 contrôles sont ajoutés : **Textr, T+TRP-Pr,** etc.. 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 et de RNAase.
d) Les microtubes sont ensuite refermés de façon étanche et transférés dans le bloc du thermocycleur

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

Les différents paramètres de la PCR espèce spécifique pour la détection de *P. ramorum* sont les suivants (Ioos *et al.*, 2006) :

Etape		Température de consigne	Durée programmée	Nombre de cycles
1	Dénaturation initiale	95 °C	**- 3 min** pour une polymérase classique **- 8 min** pour une polymérase liée à un anticorps (type Amplitaq Gold®)	1
2	Dénaturation	94°C	30 sec	**35**
	Hybridation	**58°C**	30 sec	
	Polymérisation d'ADN	72 °C	60 sec	
3	Elongation finale	72°C	7 min	1
4	Conservation (facultatif)	7°C	Jusqu'à intervention du manipulateur	-

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

936- 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).

9361- 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 environ 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) Déposer le gel refroidi dans la cuve d'électrophorèse, vérifier qu'il est suffisamment recouvert de tampon d'électrophorèse, sinon compléter.
c) 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.
d) Pour n tubes de PCR déposer n gouttes de 2 µl de tampon de charge dans n puits d'une plaque de microtitration ou sur une feuille de parafilm. *nota* : le tampon de charge peut être directement ajouté au produit d'amplification dans le tube de PCR au prorata du **Vreac.**
e) Prélever chaque amplifiat (8 µl) et le mélanger délicatement par aspiration refoulement avec le tampon de charge.

f) Déposer délicatement l'amplifiat mélangé au tampon de charge dans le puit correspondant.
g) Lorsque tous les amplifiats, les différents contrôles et le marqueur de masse moléculaire sont déposés sur le gel, mettre en marche le générateur de tension (4V / cm , pendant 1 heure)

9362- 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 d'environ 0.5 µg/ml. La cuve peut être disposée sur un agitateur à bascule.
b) Le gel est ensuite incubé au moins 1 min dans une cuve de "lavage" contenant de l'eau du robinet. La cuve est disposée sur le même agitateur à bascule.
c) Le gel est ensuite placé 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 ;
d) 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. La prise de vue devra s'effectuer rapidement, car l'ADN est dégradé lors d'une exposition prolongée aux UV.

937- Expression des résultats

9371- Validation de l'analyse

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

- Le **T-** ne présente aucun fragment amplifié de 527 pb visible => il n'y a pas eu de contamination accidentelle pendant la préparation du mix et l'ajout des **S-ADN cibles**.
- Le **T+TRP-Pr** présente un fragment amplifié visible et de taille attendue (environ 527 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. ramorum*.
- Le **Text** et le cas échéant le **T-proc** ne présentent aucun fragment amplifié de 527 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**.
- Pour chaque prise d'essai : si aucun fragment amplifié de 527 pb n'est visible, l'amplification du TIA (ca 720 pb) doit avoir 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 pour le T+TRP-Pr et pour certaines S ADN cibles, la présence de séquences cible de P. ramorum 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 quand à l'absence d'inhibiteur.

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

L'amplification du T LOD, s'il a été utilisé, traduit le fait que le test PCR s'est effectué dans des conditions optimales (qualité des consommables, composition du mix réactionnel, conditions thermodynamiques des cycles de PCR) pour permettre la détection de la plus petite quantité détectable de *P. ramorum.*

9372- Lecture des résultats

Si l'analyse est validée conformément au § 9371, les résultats peuvent être considérés comme interprétables pour l'ensemble des S-ADN cibles, donc des prises d'essai, testées au cours du même test PCR.

- Si pour une S-ADN cible testée par PCR « TRP-PRAM-F/R », un fragment amplifié est visible et qu'il a la taille attendue (environ 527 pb), la prise d'essai est dite positive pour *Phytophthora ramorum* par le test PCR TRP-PRAM-F/R. Cette S-ADN cible sera testée pour confirmation par PCR « GPA-PRAM-F/R ». cf. § 94.

- 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 *Phytophthora ramorum*. Le résultat sera alors exprimé par une phrase du type " ***Phytophthora ramorum*** **non détecté dans l'échantillon analysé par PCR espèce-spécifique dans la limite de détection de la technique. ».**

- **Si pour une S-ADN cible** testée, ainsi que pour ses dilutions éventuelles, aucun fragment amplifié n'est visible et que le TIA n'a pas été correctement amplifié, le résultat sera alors exprimé par une phrase du type « **échantillon non analysable, présence d'inhibiteurs** ».

94 - Test de la solution d'ADN cible par PCR « GPA-PRAM-F/R »

931- Dispositions particulières

Pour toute série de test par PCR « GPA-PRAM-F/R » :

- **Un contrôle positif d'amplification** sera systématiquement introduit à cette étape. Une prise d'échantillon "**T+GPA-Pr**" correspondant i) à un extrait d'ADN génomique d'un isolat référencé de *P. ramorum* ou ii) à une solution de bactéries contenant un plasmide dans lequel a été inséré la zone cible (248 pb) des amorces de PCR GPA-PRAM-F et GPA-PRAM-R. La solution de T+GPA-Pr est conservée au congélateur. Ce contrôle sera systématiquement testé 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.

- **Un contrôle de limite pratique de détection** (**'T LOD'**) peut être facultativement introduit à cette étape. Il permet de vérifier que la réaction PCR s'est effectué de façon optimale (conditions thermodynamique et chimique) pour que la plus petite quantité détectable de *P. ramorum* puisse avoir été détectée dans un échantillon.
- **Un contrôle négatif d'amplification** (**'T-'**) sera systématiquement introduit à cette étape. Une prise d'échantillon "eau" subira donc toutes les phases de l'analyse à partir de la préparation du mélange réactionnel de PCR pour vérifier l'absence de contamination lors de cette phase et lors du chargement des **S-ADN cibles** dans les tubes individuels de PCR (2^{eme} type de faux positifs).
- **Le contrôle d'extraction ('Textr')** sera introduit à cette étape ainsi que le **contrôle négatif de processus ('T-proc')** s'il a été utilisé lors de l'extraction. Ce dernier représente un extrait d'ADN exogène prêt à l'emploi ne présentant aucun risque d'amplification croisée avec le test de PCR GPA-PRAM-F/R et qui peut faciliter la co-extraction d'ADN cible lorsque ce dernier est présent à une très faible quantité.

942- Préparation du mélange réactionnel GPA-PRAM-F/R

La préparation du mélange réactionnel (="**mix**") GPA-PRAM-F/R s'effectuera exactement dans les mêmes conditions que décrit en §932. La composition finale du mix 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 (10 mg/ml)	0.6 µg /µl
Chlorure de Magnésium 25 mM	2 mM
Amorce sens "GPA-PRAM-F" (10 µM)	0.45 µM
Amorce antisens "GPA-PRAM-R" (10 µM)	0.45 µM
dNTPs mix 4 x 25 mM	4 x 200 µM
Polymérase à ADN	0.5 U / 20µl de Vreac

943 Distribution du mix dans les microtubes de PCR

Idem §933

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

Idem §934

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

Idem §935

946- Séparation par électrophorèse et révélation des gels d'électrophorèse

Idem §936

947- Expression des résultats

9471- Validation de l'analyse

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

- Le **T-** ne présente aucun fragment amplifié de 248 pb visible => il n'y a pas eu de contamination accidentelle pendant la préparation du mix et l'ajout des **S-ADN cibles**.
- Le **T+GPA-Pr** présente un fragment amplifié visible et de taille attendue (environ 248 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. ramorum*.
- Le **Text** et le cas échéant le **T-proc** ne présentent aucun fragment amplifié de 248 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**.

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.

L'amplification du T LOD, s'il a été utilisé, traduit le fait que le test PCR s'est effectué dans des conditions optimales (qualité des consommables, composition du mix réactionnel, conditions thermodynamiques des cycles de PCR) pour permettre la détection de la plus petite quantité détectable de *P. ramorum.*

9472- Lecture des résultats

Si l'analyse est validée conformément au § 9471, les résultats peuvent être considérés comme interprétables pour l'ensemble des S-ADN cibles, donc des prises d'essai, testés au cours du même test PCR.

- Si pour une S-ADN cible testée par PCR « GPA-PRAM-F/R », un fragment amplifié est visible et qu'il a la taille attendue (environ 248 pb), la prise d'essai est dite positive pour *Phytophthora ramorum* par le test PCR GPA-PRAM-F/R. Le résultat sera alors exprimé par une phrase du type « ***P. ramorum* détecté dans l'échantillon 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 *Phytophthora ramorum* par PCR GPA-PRAM-F/R. Le résultat sera alors exprimé par une phrase du type " **Présomption de présence de *Phytophthora ramorum* dans l'échantillon analysé par PCR espèce-spécifique ».** Le deuxième test ne confirmant pas le premier, il sera nécessaire de procéder à une nouvelle prise d'essai. Un nouvel échantillon pourra être demandé au demandeur d'analyse.

10 - DESINFECTION ET DESTRUCTION DES DECHETS 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 de parasite 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 manipulés 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 - REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

Anonyme (2004) Décision de la commission du 29 avril 2004 modifiant la décision 2002/757/CE relative à des mesures provisoires d'urgence en matière phytosanitaire visant à empêcher l'introduction et la propagation dans la Communauté de *Phytophthora ramorum* Werres, De Cock & Man in 't Veld sp.nov. [notifiée sous le numéro C(2004) 1585] (2004/426/CE)

Anonymous (2002) Commission Decision (2002/757/EC) of 19 September 2002 on provisional emergency phytosanitary measures to prevent the introduction into and the spread within the Community of *Phytophthora ramorum* Werres, De Cock & Man in 't Veld sp. nov. OJ N° L252, 2002-09-20, 3739.

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

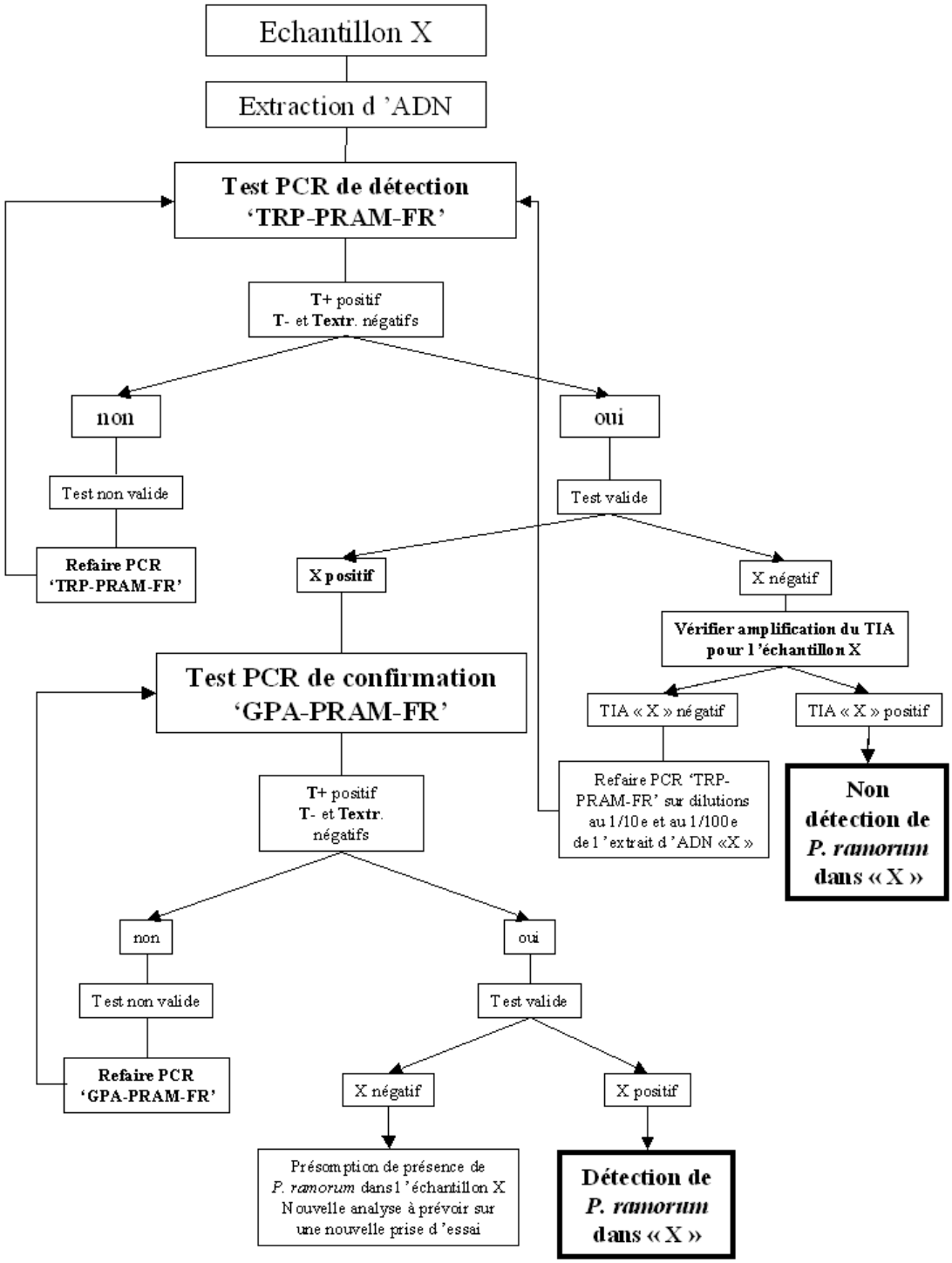
Ioos R., Laugustin L., Rose S., Schenck N., Husson C., Frey P. (2006) Usefulness of single copy genes containing introns in *Phytophthora* for the development of detection tools for the regulated species *P. ramorum* and *P. fragariae*. European Journal of Plant Pathology 116: 171-176.

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

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

Joël MATHURIN

Annexe 1 : Diagramme décisionnel



ANNEXE 2 : 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