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/C2007-8015** **Date: 12 juillet 2007**

Date de mise en application : immédiate

Date limite de réponse:

Nombre d'annexe : 1

Confidentialité : tout public

Objet : Méthode officielle de détection de *Plasmopara halstedii* par PCR pour publication au B.O.

Résumé : Cette méthode s'applique à la détection de *Plasmopara halstedii* (Farlow) Berlese & de Toni dans un lot de graines par la technique d'amplification par polymérisation en chaîne

Mots-clés : Mycologie - Méthode de détection – *Plasmopara halstedii* - 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

Végétal : *Helianthus annuus*

détection de : ***Plasmopara halstedii* (Farlow) Berlese & de Toni** dans un lot de graines

par la technique d'amplification par polymérisation en chaîne

Réf. : MHs/07/24 version a

<u>Laboratoire de référence</u> :
LNPV Unité de Mycologie
Agricole et Forestière de Nancy
Domaine de Pixérécourt, BP90059
54220 MALZEVILLE

Fevrier 2007

Végétal : *Helianthus annuus*
détection de :
Plasmopara halstedii (Farlow) Berlese & de Toni
dans un lot de graines 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 2

5- Appareillage 3

51- Matériel 3

52- Verrerie 3

6- Réactifs et produits 3

7 - Consommables à usage unique 5

71- Consommables plastiques 5

8 - Echantillonnage et échantillons 5

81 - Définitions 5

82 - Prélèvement des sous-échantillons : prises d'essai 5

83 - Conservation des échantillons 5

9 - Mode opératoire 6

91 - Broyage de l'échantillon 6

92 - Extraction et purification de l'ADN Total 6

93 - Test de la solution d'ADN cible par PCR espèce spécifique 6

931- Dispositions particulières 6

932- Préparation du mélange réactionnel PHAL-F/R 7

933 Distribution du mix dans les microtubes de PCR 7

934 Addition des solutions S-ADN cible dans les microtubes de PCR 8

935- Paramètres de l' amplification par polymérisation en chaîne 8

94- Séparation par électrophorèse et révélation des gels d'électrophorèse 8

941- Electrophorèse 8

942- Révélation du gel d'électrophorèse 9

95- Expression des résultats 9

951- Validation de l'analyse 9

952- Lecture des résultats 9

10 - Désinfection et destruction des déchets d'analyse 10

11 - Références bibliographiques 10

INTRODUCTION

Plasmopara halstedii est l'agent du mildiou du tournesol. Ce parasite obligatoire est devenu économiquement important parce qu'il cause des pertes de rendements parfois très conséquentes dans les champs qu'il affecte, mais aussi à cause des coûts de protection phytosanitaire et de sélection génétique qu'il implique. Afin de prévenir l'introduction de nouveaux génotypes agressifs et d'isolats résistant aux fongicides dans des aires de production de tournesol, de strictes mesures phytosanitaires sont requises. Afin de limiter la dissémination du parasite, une méthode efficace de contrôle phytosanitaire des graines est essentielle puisque ces dernières représentent le principal vecteur de *P. halstedii* sur de longues distances.

1- OBJET

Conformément à l'arrêté du 8 mai 2000 (Directive 2000/29/CE) relatif aux exigences sanitaires des végétaux ou produits végétaux (Annexe II, Partie AII) *Plasmopara halstedii* est considéré comme organisme de quarantaine en tant qu'organisme nuisible dont l'introduction et la dissémination doivent être interdites dans tous les états membres s'il se trouve sur graines de tournesol.
L'objet de cette méthode est de détecter la présence de *P. halstedii* dans un échantillon de graines de tournesol.
Cette méthode est qualitative, elle permet de détecter *P. halstedii* 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. halstedii* ou contaminés 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. halstedii*.

2-DOMAINE D'APPLICATION

La méthode s'applique sur des graines de tournesol non traitées (sans enrobage fongicide).
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.

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. halstedii* permet de détecter et d'amplifier une portion spécifique de l'ADN génomique de cet Oomycète. La détection s'effectue classiquement sur trois extraits d'ADN total obtenus respectivement à partir de 3 sous-échantillons de l'échantillon à analyser.
La portion d'ADN détectée et amplifiée est située dans la zone 28S de l'ADN ribosomique du génome de *P. halstedii*. Elle est détectée par l'utilisation de marqueurs qui sont des amorces de PCR définies à partir de régions dont la séquence est spécifique de *P. halstedii.* Elle a une taille attendue de 308 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- 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 graines de volume de broyage adapté et capable de réduire l'échantillon de graines en poudre grossière (de type Microtron ou équivalent)
- Petites ustensiles (spatules, scalpels, etc.) pour le prélèvent de poudre de graines

Facultatif mais recommandé :

- 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

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. (2007) 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 :

Séquence de l'amorce sens « **PHAL-F*** »:	5'- TATCTCTAAGTTGCTTATAC-3'
Séquence de l'amorce antisens « **PHAL-R*** »:	5'-AGCATATACAGCACATACG-3'

* : Ioos *et al*., 2007

Les solutions mères de chacune de ces amorces sont conservées à –20°C 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 $10^{ème}$ 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. (2007) 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. halstedii*, 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 (environ 300 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 308 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 utiliser sous forme de poudre.

Protéinase K :

La protéinase K est à préparer et à stocker congelée en solution de 10 mg ± 1 $mg.ml^{-1}$

Tampon de l'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 1

Tampon de charge d'ADN amplifié :
Il existe des solutions commerciales prêtes à l'emploi, ou à fabriquer à façon cf. annexe 1

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

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 1

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.

8 - ECHANTILLONNAGE ET ECHANTILLONS

81 - Définitions

- Il est souhaitable que la taille de l'échantillon de graines reçu au laboratoire pour recherche de *P. halstedii* permette le prélèvement de trois sous-échantillons de 35 g ± 2 g. Chacun des sous échantillons représente une unité d'analyse.
- Dans le cas où il n'est pas possible de préparer trois sous-échantillons, il est toutefois possible de réaliser l'analyse sur 2 voire sur un seul prélèvement de 35 g ± 2 g. Toutefois, la probabilité de détecter P. halstedii en sera affectée dans le cas d'échantillons présentant des niveaux d'infection par le parasite très faibles. Il en sera fait mention dans le rapport d'analyse.
- Si l'échantillon reçu au laboratoire pour analyse pèse moins de 35 g, la qualité du broyage ne pourrait pas être assurée et l'analyse ne doit pas être entreprise.

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

A partir de l'échantillon reçu au laboratoire, trois prélèvements de 35 g ± 2 g sont effectués de façon aléatoire, à l'aide d'outils de prélèvement préalablement nettoyés à l'hypochlorite de sodium. Dans chaque sous-échantillon qui sera broyé, un prélèvement d'environ 500 µl de poudre de graine (environ un quart du microtube de 2 ml) sera prélevé et constituera la prise d'essai.

83 - Conservation des échantillons

Les échantillons de graines peuvent être conservés jusqu'à 1 mois au réfrigérateur ou jusqu'à 6 mois au congélateur avant analyse. Il est indispensable de les conserver dans des sachets non étanches (par exemple sac en papier) afin d'éviter la présence d'une humidité trop importante et le développement de champignons ou bactéries saprophytes.
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.

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

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.
Les sous-échantillons seront directement broyés dans le bol de broyage du mixer, jusqu'à obtenir une poudre homogène. Un prélèvement d'environ 500 µl de poudre sera effectué pour chaque sous- échantillon, de façon aléatoire et transféré dans un microtube stérile de 2 ml.
Puisque l'objectif du test est de détecter la présence de *P. halstedii* dans un échantillon, il n'est pas nécessaire de désinfecter le bol de broyage entre chaque broyage des différents sous-échantillons issus d'un même échantillon. En revanche, la désinfection à l'aide d'une solution d'hypochlorite de sodium est obligatoire entre deux sous-échantillons provenant d'échantillons différents.

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 le test de PCR PHAL-F/R (témoin négatif de processus, **T-proc**).

92 - 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, ajouter environ 2 à 3 mg de PVPP en poudre et environ 10 µl de protéinase K (10 mg/ml). 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. Refermer le tube.
[b] Vortexer le tube 5-10 secondes à l'endroit et à l'envers
[c] Incuber le microtube contenant la prise d'essai au bain marie ou au bain à sec pendant 20 min ± 2 min à la température préconisée par le fabricant de kits d'extraction (généralement 65°C ± 3°C).
[d] Suivre ensuite le protocole d'extraction et de purification indiqué par le fabricant en y incluant obligatoirement au préalable une phase de centrifugation (3 à 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.
[e] 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 recommandé de diluer cette solution au 10ème dans le tampon d'élution ou équivalent. La solution « S-ADN cible » sera analysée ainsi que « S-ADN cible /10ème ».
[f] S-ADN cible et S-ADN cible /10ème sont conservées au congélateur avant analyse.

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

931- Dispositions particulières

Pour toute série de test par PCR espèce –spécifique :

a) **Un contrôle positif d'amplification** sera systématiquement introduit à cette étape. Une prise d'échantillon "**T+Ph**" correspondant i) à un extrait d'ADN génomique d'un isolat référencé de *P. halstedii* ou ii) à une solution de bactéries contenant un plasmide dans lequel a été inséré la zone cible (308 pb) des amorces de PCR PHAL-F et PHAL-R. La solution de T+Ph 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. halstedii* 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 PHAL-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 PHAL-F et PHAL-R. Ce fragment est de taille supérieure à la taille de la cible chez *P. halstedii* (ca 800 pb). Le TIA est préparé en parties aliquotes à une concentration de 0.5 UFC / µl et conservé au congélateur[1].
La présence de ce témoin dans le mix réactionnel permettra d'amplifier en parallèle un fragment de 800 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 PHAL-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 (10mg/ml)	0.8 µg /µl
Chlorure de Magnésium 25 mM	2 mM
Amorce sens "PHAL-F" (10µM)	0.45 µM
Amorce antisens "PHAL-R" (10µM)	0.45 µM
T.I.A. (1.7 UFC./µl)	1.7 UFC /20µl de Vreac
dNTPs mix 4 x 25mM	4 x 150 µM
Polymérase à ADN	0.5 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 + 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 PCRindividuels 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)

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

b) **Vdist** est distribué dans chaque tube de PCRà 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+Ph,** 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. halstedii* sont les suivants (Ioos *et al.,* 2007) :

Etape		**Température de consigne**	Durée programmée	Nombre de cycles
1	Dénaturation initiale	94 °C	- **5 min** pour une polymérase classique - **8 min** pour une polymérase liée à un anticorps (type Amplitaq Gold®)	1
2	Dénaturation	94°C	20 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)	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.

94- 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 "**amplifiât**" (le terme ne préjuge pas du fait qu'il y ait eu effectivement amplification ou non).

941- Electrophorèse

Il est très fortement recommandé de manipuler les amplifiâts (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 amplifiât 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 amplifiât (8 µl) et le mélanger délicatement par aspiration refoulement avec le tampon de charge**)**.
f) Déposer délicatement l'amplifiât mélangé au tampon de charge dans le puit correspondant
g) Lorsque tous les amplifiâts, 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)

942- 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 environ 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 d'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.

95- Expression des résultats

951- Validation de l'analyse

La validation de l'analyse s'effectue en observant les résultats des amplifiâts 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 308 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+Ph** présente un fragment amplifié visible et de taille attendue (environ 308 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. halstedii*.
- Le **Text** et le cas échéant le **T-proc** ne présentent aucun fragment amplifié de 308 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 308 pb n'est visible, l'amplification du TIA (800 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+Ph et pour certaines S ADN cibles, la présence de séquences cible de P. halstedii 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'amplifiât 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 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. halstedii.*

952- Lecture des résultats

Si l'analyse est validée conformément au § 951, 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 308 pb), la prise d'essai est dite positive pour *P. halstedii*.
  Le résultat sera alors exprimé par une phrase du type " ***P. halstedii* 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, et que le TIA a été correctement amplifié, la prise d'essai est dite négative pour *P. hasltedii.*
  Le résultat sera alors exprimé par une phrase du type " ***P. halstedii*** **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** ».

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, 2000 : Directive n°2000-29 du conseil du 8 mai 2000 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. *Journal officiel des communautés européennes* du 10/07/2000, J.O. N°L 169, p1.

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., Tourvieille J., Tourvieille de Labrouhe D. (2007) Development of a PCR test to detect downy mildew (*Plasmopara halstedii*) in sunflower seed. *Plant Pathology* 56: 209-218.
.
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 : 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