INFORMATION

Liberté • Égalité • Fraternité
RÉPUBLIQUE FRANÇAISE

MINISTERE DE L'ALIMENTATION, DE L'AGRICULTURE ET DE LA PÊCHE

Direction générale de l'alimentation
Service de la prévention des risques sanitaires de la production primaire
Sous-direction de la qualité et de la protection des végétaux
Bureau des semences et de la santé des végétaux

Adresse : 251 rue de Vaugirard
75 732 PARIS CEDEX 15
Suivi par : Olivier DUFOUR
Tél : 01.49.55.81.64
Courriel institutionnel : bssv.sdqpv.dgal@agriculture.gouv.fr
Réf. Interne : BSSV/ 2010-02-030
MOD10.22 B 29/10/09

NOTE DE SERVICE

DGAL/SDQPV/N2010-8053

Date: 23/02/2010

Date de mise en application : Immédiate
Abroge et remplace :
Date limite de réponse :
Nombre d'annexes : 3
Degré et période de confidentialité :

Objet : Méthode d'analyse MOA 003 pour la détection de *Gibberella circinata* dans les matrices de graines et de tissus végétatifs

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

Résumé : Publication de la méthode officielle pour la détection de *Gibberella circinata.*

Mots-clés : Mycologie, méthode officielle, analyses, détection, *Gibberella circinata*, tissus végétatif, graines, pins, *Pinus* spp., *Pseudotsuga menziesii*.

Destinataires
Pour information : DRAAF-SRAL DAF-SPV LNPV Laboratoires agréés

La présente note a pour objet la publication officielle de la méthode de détection de *Gibberella circinata* Nirenberg & O'Donnell (anamorphe *Fusarium circinatum* Niremberg & O'Donnell), agent pathogène de *Pinus* spp. et de *Pseudotsuga menziesii*, responsable de chancres résineux sur arbres adultes et pourritures racinaires ou mortalité chez les jeunes semis.
Les graines et les jeunes plants infectés de ces conifères peuvent véhiculer le parasite de régions infectées vers des régions saines.
Conformément à la décision communautaire 2007/433/CE du 18 juin 2007 relative aux mesures d'urgence phytosanitaires provisoires pour prévenir l'introduction et la dissémination au sein de l'Union européenne de *Gibberella circinata*, ce dernier est considéré comme organisme réglementé. A cette date, il n'existait pas de méthode officielle pour la détection de ce parasite. La littérature scientifique internationale ne proposait qu'une méthode de détection de ce parasite sur échantillons d'air (capture de spores anémophiles) mais aucun test pour la détection spécifique de ce parasite *in planta*.

La partie A de la méthode présentée en annexe permet de détecter la présence de *G. circinata* dans une matrice de tissus végétatifs quelque soit son état physiologique, notamment des infections latentes. La prise d'essai pour analyse est limitée dans l'échantillon d'origine.
La méthode utilisée permet de détecter la présence de *G. circinata* dans des tissus végétatifs de *Pinus* spp. ou *Pseudotsuga menziesii* par un test de détection par amplification par polymérisation en chaîne (PCR) en temps réel et par un test de confirmation des positifs par un test PCR conventionnelle. L'utilisation d'amorces et d'une sonde marquée, dont la combinaison est spécifique de *G. circinata*, permet de détecter et d'amplifier des portions discriminantes de l'ADN génomique de ce champignon. La détection et l'éventuelle confirmation s'effectuent dans un extrait d'ADN total obtenu à partir de prélèvements de tissus végétatifs sur les échantillons reçus au laboratoire.

La partie B de la méthode présentée en annexe permet de détecter la présence de *Gibberella circinata* dans une matrice de semence. La fréquence d'infection des semences par *Gibberella circinata* peut être relativement faible et les semences infectées ne présentent pas de symptôme. La méthode utilisée permet de traiter un grand nombre de graines simultanément par enrichissement biologique suivi par une amplification par polymérisation en chaîne en temps réel (real-time PCR) et d'un test par PCR conventionnelle.
L'utilisation d'amorces et d'une sonde marquée, dont la combinaison est spécifique de *Gibberella circinata*, permet de détecter et d'amplifier des portions discriminantes de l'ADN génomique de ce champignon. La détection s'effectue dans un extrait d'ADN total obtenu à partir de prises d'essai de graines broyées dans un milieu d'enrichissement. Le développement de cette méthode a fait l'objet d'une publication scientifique (Ioos et al. 2009 Phytopathology 99, 582-590) qui présente aussi par ailleurs une partie des données de validation.

La partie C de la méthode présentée en annexe permet de détecter la présence de *Gibberella circinata* dans une matrice de tissus végétatifs sous une forme biologiquement active (non quiescente) sous réserve de présence significative d'espèces saprophytes ou de parasites secondaires. La prise d'essai pour analyse est plus importante dans l'échantillon d'origine.
La présente version de la méthode a été rédigée en adaptant une méthode d'isolement des *Fusarium* spp. utilisée sur les céréales (méthode officielle MH.03.16) à la recherche spécifique de la forme imparfaite de *Gibberella circinata* (*Fusarium circinatum*). L'identification morphologique de cette espèce est basée sur la littérature scientifique et sur le retour d'expérience du panel mycologie de l'OEPP.
La méthode repose sur l'emploi de la technique de l'isolement mycologique sur milieu semi sélectif pour la détection des *Fusarium* spp. Les isolats de *Fusarium* spp. éventuellement présents dans la matrice analysée sont ensuite transférés du milieu d'isolement vers deux milieux d'étude spécifiques. Après incubation, leurs caractéristiques macro- et microscopiques sont étudiées et permettent d'aboutir à l'identification de l'espèce *Fusarium circinatum* (anamorphe de *Gibberella circinata*) si elle est présente.

Toute détection de *Gibberella circinata* dans une matrice de tissus végétatifs sera réalisée en parallèle avec la partie A et la partie C de cette méthode officielle d'analyse.
Vous trouverez en annexe à cette note d'information la méthode officielle d'analyse *Gibberella circinata* avec ses trois parties distinctes.

L'Ingénieur en Chef des Ponts, des Eaux et des Forêts
Adjoint à la Sous-Directrice de la Qualité et de la Protection des Végétaux

Robert TESSIER

Liberté • Égalité • Fraternité
RÉPUBLIQUE FRANÇAISE

MINISTÈRE
DE L'ALIMENTATION
DE L'AGRICULTURE
ET DE LA PÊCHE

METHODE OFFICIELLE D'ANALYSE

Détection de *Gibberella circinata*

Réf. : MOA 003 Partie A version 1a

Droits de reproduction et Copyright

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

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

Dates de validité du présent document

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

Cependant, et sauf indication contraire explicite, la version précédente peut encore être utilisée pendant une durée maximale de 15 mois à compter de la date de publication de la nouvelle version, afin de tenir compte des cycles d'accréditation auxquels sont soumis les laboratoires de référence, agréés et reconnus officiellement.

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

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

MOA 003 partie A	Consultation publique		Validité	
Numéro de la version	Début	Fin	Début	Fin
Version 1 a	Mars 2010	Juin 2011	Mars 2010	

SOMMAIRE

PREAMBULE **5**

Objet des méthodes officielles 5
Glossaire, abréviations et documents connexes 5
Limites imposées aux laboratoires agréés ou reconnus 5
Échantillonnage et échantillon 5
Modification des méthodes officielles 5
Considérations d'ordre métrologique 6
Obligations réglementaires et limites de responsabilité 6
Revue des méthodes officielles, amendement et modification 7

ORIGINE DE LA METHODE ET REMERCIEMENTS **8**

PRINCIPALES MODIFICATIONS PAR RAPPORT A LA VERSION PRECEDENTE **9**

Modifications 9
Améliorations 9

DESCRIPTION DE LA METHODE **10**

1. Objet. 10
2. Domaine d'application. 11
3. Présentation schématique de la détection 12
4. Produits et consommables 12
   4.1. Tampons 13
   4.2. Autres réactifs et consommables 13
5. Appareillage et matériel 15
6. Contrôles et témoins 15
7. Prise d'essai 16
8. Etapes de l'analyse 17
   8.1. Broyage des prises d'essai et extraction d'ADN total 17
   8.2. Test de détection par PCR en temps réel 17
   8.3. Test de confirmation par PCR conventionnelle 20
9. Résultats 21
   9.1. Validation de l'analyse 21
   9.2. Interprétation et formulation des résultats 22
10. Élimination des matériels susceptibles d'être contaminants 22
11. Conservation des reliquats de matériels utilisés 22

LISTE DES DOCUMENTS OFFICIELS APPELES PAR LA METHODE **23**

BIBLIOGRAPHIE SUCCINCTE **24**

ANNEXE I **25**

PREAMBULE

OBJET DES METHODES OFFICIELLES

Les méthodes officielles, au sens du décret 2006-7 du 4 Janvier 2006, sont les méthodes validées par le ministère chargé de l'agriculture pour l'utilisation dans le cadre des actes officiels relevant de ses services (plans de contrôle et de surveillance, contrôles à l'importation et à l'exportation…). Ces méthodes concernent le diagnostic, la détection ou l'identification d'organismes nuisibles aux cultures, d'organismes envahissants ou d'organismes génétiquement modifiés pour le domaine d'application précisé dans la méthode.
Ces méthodes servent de « méthodes publiées » au sens de la norme ISO 17025 pour l'accréditation des laboratoires par le COFRAC.

GLOSSAIRE, ABREVIATIONS ET DOCUMENTS CONNEXES

Afin de limiter les problèmes d'interprétation des termes employés, le vocabulaire utilisé dans les méthodes officielles du ministère chargé de l'agriculture est issu des normes, guides ou glossaires nationaux ou internationaux appropriés (AFNOR, ISO, CIPV, OEPP…).
Le glossaire GLO-001 reprend les principales définitions. L'attention des lecteurs est attirée sur le fait que les termes intégrés au glossaire ne sont, en règle générale, pas spécifiquement repérés dans le corps des méthodes officielles.
Certains documents (composition de milieux et tampons…) peuvent être communs à plusieurs méthodes officielles. Pour faciliter leur harmonisation et leur mise à jour, ils sont rassemblés dans des recueils spécifiques, considérés comme faisant partie intégrante des méthodes officielles. Les méthodes officielles appellent alors ces documents spécifiques en donnant leur code tel que repris dans les recueils.

LIMITES IMPOSEES AUX LABORATOIRES AGREES OU RECONNUS

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

ECHANTILLONNAGE ET ECHANTILLON

L'échantillonnage, est de la responsabilité des préleveurs et ses modalités sont définies par ailleurs.
L' échantillon reçu est réputé être homogène en l'état de sa réception, par contre, il n'est pas forcément représentatif du lot d'où il provient et le laboratoire ne pourra en aucune façon attester du caractère représentatif au sens de la statistique.
Le laboratoire peut être amené à séparer l'échantillon reçu en sous-échantillons pour les besoins de l'analyse, il s'agit alors d'une simple division et non d'un réel sous-échantillonnage au sens de la statistique, et le laboratoire n'a pas de ce fait à être accrédité pour l'échantillonnage.

MODIFICATION DES METHODES OFFICIELLES

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

Une méthode dérivée résulte de modifications de portées limitées appliquées à la méthode officielle (par exemple, remplacement d'une procédure d'extraction de l'ADN par une autre, utilisation d'un appareil de préparation de l'échantillon différent de celui prévu dans la méthode officielle…).
Une méthode alternative s'appuie sur des principes ou des technologies différentes de celles décrites dans les méthodes officielles, il s'agit réellement d'une autre méthode.
Un réactif-clé est un réactif directement impliqué dans la reconnaissance des organismes recherchés.
Les laboratoires agréés évaluent les conséquences de la modification (d'une méthode par une autre ou d'un réactif-clé par un autre) conformément aux prescriptions du LNR et transmettent le dossier d'évaluation correspondant au LNR pour validation de cette modification.

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

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

CONSIDERATIONS D'ORDRE METROLOGIQUE

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

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

OBLIGATIONS REGLEMENTAIRES ET LIMITES DE RESPONSABILITE

La mise en œuvre des méthodes officielles s'applique sans préjudice des réglementations françaises et communautaires ou des exigences normatives auxquelles doivent se soumettre les laboratoires (circulation, détention, manipulation des organismes nuisibles, détention des substances réglementées, bonnes pratiques de laboratoire, santé et sécurité au travail, mesures de confinement, agrément des laboratoires, déclaration à la commission de génie génétique …).
Dans un certain nombre de cas, les méthodes peuvent appeler l'attention des lecteurs sur des risques potentiels liés par exemple à la dangerosité de certains produits ou à la rupture du confinement. Ces mises en garde ne sont destinées qu'à aider les lecteurs et n'ont vocation ni à être exhaustives, ni à se substituer aux exigences réglementaires existantes.
Toute personne physique ou morale constatant la présence, sur un végétal, une partie de végétal ou un produit d'origine végétale, d'un organisme nuisible réglementé a l'obligation d'en faire déclaration auprès des services régionaux de l'alimentation des directions régionales de l'alimentation, de l'agriculture et de la forêt.

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

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

REVUE DES METHODES OFFICIELLES, AMENDEMENT ET MODIFICATION

Les méthodes officielles sont revues périodiquement à l'initiative du ministère chargé de l'agriculture ou du laboratoire national de référence. A chaque modification, le code de la méthode change comme indiqué au chapitre « principales modifications par rapport à la version précédente ».
Les usagers sont également invités à faire connaître dans les meilleurs délais leurs remarques, commentaires et suggestions, et à signaler toute erreur, omission ou imprécision constatées.

ORIGINE DE LA METHODE ET REMERCIEMENTS

La présente version de la méthode a été rédigée en se basant sur les résultats d'un projet de recherche mené par le Laboratoire National de la Protection des Végétaux (station de mycologie, Nancy) visant à mettre au point une technique moléculaire de détection du champignon *Gibberella circinata* (Ioos et al. 2009). Elle a bénéficié de la collaboration de T. Gordon (University of California, Davis)

La présente méthode a été mise au point, optimisée et évaluée par la station de mycologie du LNPV.
Le travail de relecture et de revue documentaire a été effectué par le pôle développement de méthodes du LNPV, le bureau des semences et de la santé des végétaux et le département santé des forêts du Ministère chargé de l'alimentation, de l'agriculture et de la pêche.

PRINCIPALES MODIFICATIONS PAR RAPPORT A LA VERSION PRECEDENTE

MODIFICATIONS

Sans objet (première version publiée).

AMELIORATIONS

Sans objet (première version publiée).

DESCRIPTION DE LA METHODE

Détection de *Gibberella circinata* Nirenberg & O'Donnell (anamorphe *Fusarium circinatum* Nirenberg & O'Donnell) dans une matrice de tissus végétatifs par les techniques d'amplification par polymérisation en chaîne en temps réel et conventionnelle

1. Objet.

Gibberella circinata Nirenberg & O'Donnell (anamorphe *Fusarium circinatum* Niremberg & O'Donnell ; Syn *F. subglutinans* [Wollenweb and Reinking] Nelson, Toussoun and Marasas f. sp. *pini*) est un important agent pathogène des *Pinus* spp. et de *Pseudotsuga menziesii* qui cause des chancres résineux sur arbres adultes et pourritures racinaires ou mortalité chez les jeunes semis. Les graines et les jeunes plants infectés de *Pinus* spp. et de *Pseudotsuga menziesii* peuvent véhiculer le parasite de régions infectées vers des régions saines.

G. circinata cause des lésions qui peuvent encercler voire étrangler des branches, des racines apparentes, voire des troncs de *Pinus* spp. Chez *P. menziesii*, les symptômes décrits se limitent à des dépérissements d'extrémité de rameaux. L'extrémité des branches étranglées par la nécrose peut flétrir ou dépérir à cause d'une mauvaise circulation des flux de sèves. Les aiguilles sur ces extrémités de branches peuvent jaunir ou rougir, puis finalement tomber. Des faisceaux entiers d'aiguilles peuvent aussi finir par chuter, laissant les branches nues. Des points d'infection multiples à différents endroits de la couronne peuvent finir par causer un dépérissement généralisé à ce niveau, pour aboutir à la mort de l'arbre dans les cas les plus sévères. Des chancres à méplat ou d'aspect humide peuvent apparaître sur le tronc lorsque l'arbre présente de nombreux sites d'infections sur les branches.
Au niveau des branches, voire du tronc, l'arbre produit d'abondants suintements de résine en réponse à l'infection par ce parasite.
Le champignon n'est pas décrit comme parasite vasculaire, chaque chancre ou lésion est donc la conséquence d'une infection distincte. Les insectes foreurs sont les principaux vecteurs du parasite, et vont initier les sites d'infections sur un arbre.
Sur des plantules infectées, l'infection se manifeste généralement par un symptôme de type fonte de semis. Il est toutefois possible que le champignon affecte une plantule sans symptôme apparent pendant plusieurs mois avant d'exprimer la maladie (infection latente).

L'objet de cette méthode est de détecter la présence de *G. circinata* dans des tissus végétatifs de *Pinus* et *Ps. menziesii* par le biais d'un test de détection par PCR (Polymerase Chain Reaction) en temps-réel suivi d'un test de confirmation des positifs par PCR conventionnelle, qui ciblent chacun des régions spécifiques distinctes du génome de cette espèce.
Ces méthodes sont qualitatives, elles permettent de détecter *G. circinata* dans la limite du seuil de détection de la technique employée sans objectif de quantification.
Les échantillons pour lesquels une réponse négative est obtenue sont considérés comme indemnes de *G. circinata* ou contaminés à un niveau trop faible pour être mis en évidence par la technique utilisée.

Les portions d'ADN détectées et amplifiées (par PCR temps réel et PCR) sont situées dans deux régions différentes d'un espaceur intergénique de l'ADN ribosomique du génome de *G. circinata*. L'utilisation de deux tests complémentaires de même sensibilité s'avère particulièrement importante pour sécuriser la spécificité de détection de *G. circinata* car de nombreuses espèces de *Fusarium* phylogénétiquement proches (y compris non formellement décrites) de *F. circinatum* peuvent être présentes dans les mêmes matrices. A ce titre, le séquençage d'un des deux produits positifs de PCR peut éventuellement permettre de confirmer avec certitude l'identité de ce dernier.

Le test basé sur la PCR en temps réel est plus adapté à des analyses de série et sera utilisé comme test de détection, tandis que le test basé sur la PCR conventionnelle sera utilisé comme test de confirmation des positifs obtenus par PCR en temps réel. Ces techniques permettent de détecter l'organisme cible quel que soit son état physiologique.

2. Domaine d'application.

Objets susceptibles d'être soumis à analyse.
Cette méthode concerne uniquement les semis, plants et sujets adultes de *Pinus* spp. et *Pseudotsuga menziesii*. 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

Limitations relatives aux objets susceptibles d'être soumis à analyse.
Cette méthode a été initialement mise au point et validée sur des semences de *Pinus* spp et *Pseudotsuga menziesii*. Le protocole de prise d'essai et de broyage de tissu été adaptée pour pouvoir analyser avec le même principe des tissus végétatifs lignifiés.

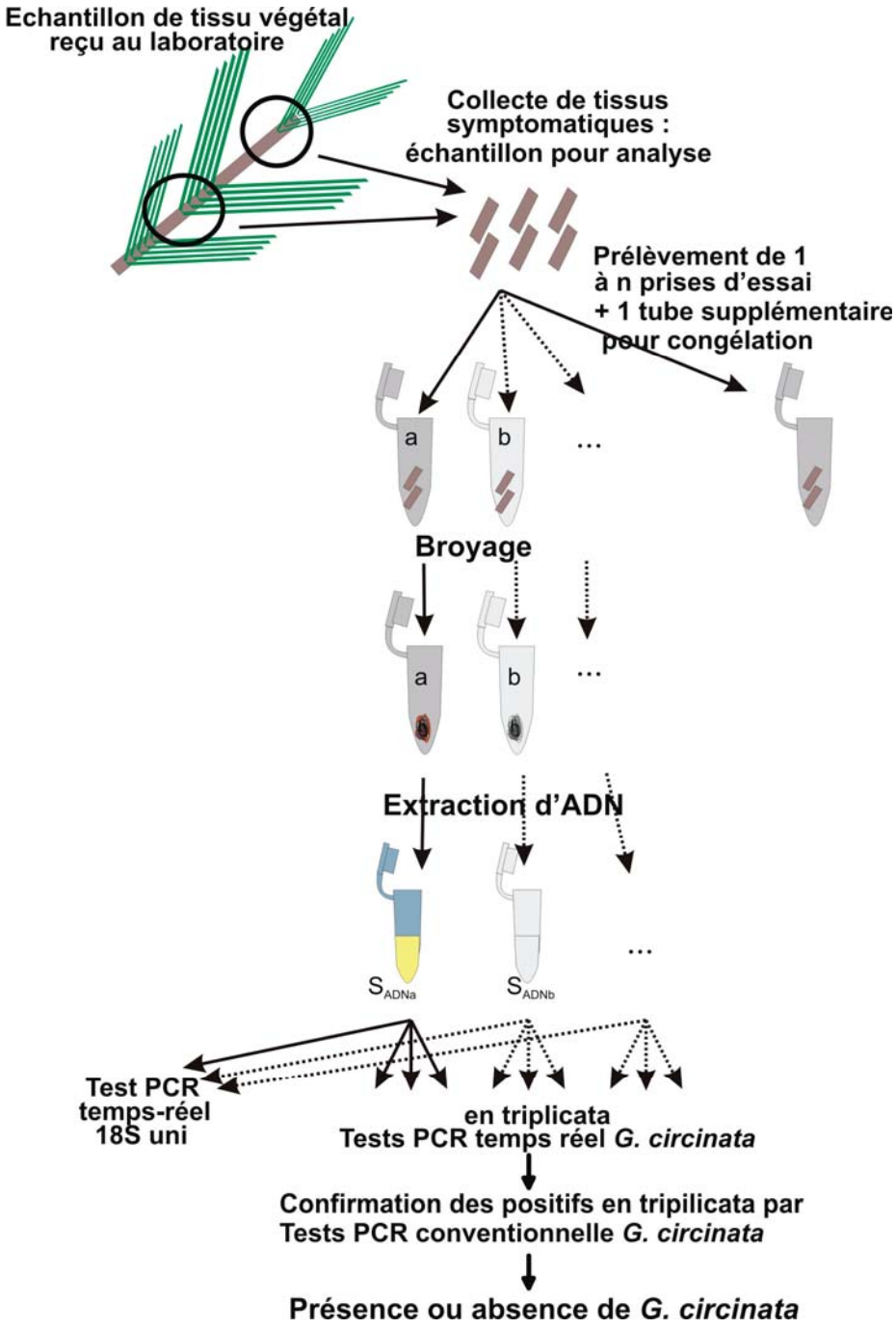
Grandeur de l'objet soumis à analyse.
La méthode s'applique sur tissus végétatifs présentant des symptômes (tissus nécrotiques de semis ou plantules, tissus sous corticaux de branches ou tronc, racines, etc.) de *Pinus* spp. et *Pseudotsuga menziesii*. Elle peut également s'appliquer sur des tissus ne présentant pas de symptôme apparent, en cas de suspicion d'infection latente.

Précaution(s) particulière(s) à prendre.
Le délai maximum entre la réception de l'échantillon et le début effectif de l'analyse doit être inférieur à 10 jours. L'échantillon devra pendant ce temps être conservé à 5±3°c.

Après extraction d'ADN les extraits peuvent être conservés congelés pendant 1 an.

L'exigence de confinement pour la manipulation de formes viables de cet agent pathogène à dissémination aérienne doit être de type NS3, dans la mesure où le laboratoire d'analyse est situé en zone indemne.

3. Présentation schématique de la détection



4. Produits et consommables

En règle générale, le manipulateur doit veiller (par l'utilisation de produits et consommables certifiés, nettoyage, stérilisation ou tout autre traitement approprié) à l'absence dans l'eau, produits et consommables utilisés, de contamination (ADN ou ARN), de nucléase, d'inhibiteur ou de tout autre élément pouvant interférer sur le résultat.

Les recommandations des fournisseurs, concernant les conditions de stockage avant utilisation, seront suivies, ainsi que la conservation en cours d'utilisation. A défaut le laboratoire définira les conditions qu'il jugera les plus optimales.

4.1. Tampons

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

Tris EDTA (10 mM Tris HCl, pH 8, 1 mM EDTA pH 8) :
- 10 mM Tris HCl, pH 8
- 1 mM EDTA, pH 8

A défaut il est possible d'utiliser le tampon d'élution fourni avec un kit d'extraction d'ADN de plante du commerce.

Tampon Tris Borate EDTA (TBE)

Il est recommandé d'utiliser des solutions commerciales prêtes à l'emploi ou à diluer à la concentration d'utilisation fixée à 0.5X

4.2. Autres réactifs et consommables

Eau de qualité Ultra Pure
L'eau ultra pure (EUP) doit présenter une qualité suffisante pour une utilisation en biologie moléculaire.

Eau de Javel ou solution d'hypochlorite de Sodium titrant au moins 1.5 % de chlore actif [produit corrosif à manipuler avec précaution]

Kits d'extraction d'ADN de plante
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 d'un mini kit d'extraction d'ADN de plante disponible dans le commerce. Le type de kit d'extraction choisi est de préférence celui validé dans Ioos *et al*. (2009) ou doit avoir démontré une efficacité au moins équivalente à ce dernier. Un protocole d'extraction interne au laboratoire peut aussi être utilisé (ex. CTAB/ Phénol-Chloroforme), mais les critères de performance de la méthode globale ainsi modifiée devront être au moins équivalents à ceux de la présente méthode.

Oligonucléotides

Cible	Amorce ou sonde	Sequence (5'-3')
G. circinata	FCIR-F[a]	TCGATGTGTCGTCTCTGGAC
	FCIR-R[a]	CGATCCTCAAATCGACCAAGA
	FCIR-P[a]	[6-FAM]-CGAGTCTGGCGGGACTTTGTGC-[BHQ1]
Plante/champignon	18S uni-F[a]	GCAAGGCTGAAACTTAAAGGAA
	18S uni-R[a]	CCACCACCCATAGAATCAAGA
	18S uni-P[a]	[JOE]-ACGGAAGGGCACCACCAGGAGT-[BHQ1]
G. circinata	CIRC1A[b]	CTTGGCTCGAGAAGGG
	CIRC4A[b]	ACCTACCCTACACCTCTCACT

[a] (Ioos et al. 2009)
[b] (Schweigkofler et al. 2004))

Les solutions mères de chacune de ces amorces sont conservées au congélateur à une concentration de 100 µM dans du tampon Tris EDTA (**TE)** ou un tampon équivalent.
Des parties aliquotes de ces solutions mères sont diluées à 30 µM dans de l'eau ultra pure pour les amorces et à 10 µM dans de l'eau ultra pure pour les sondes marquées. Ces parties aliquotes sont utilisées pour la préparation du mélange réactionnel de PCR.
Les sondes marquées, sous forme concentrée ou diluée sont conservées et manipulées en évitant une trop longue et trop intense exposition à la lumière, ou en les protégeant de cette dernière (risque de

photolyse). D'autres fluorophores rapporteurs peuvent être utilisés pour chaque sonde, sous réserve que le fluorophore extincteur associé soit adapté.

ADN polymérase thermostable

N'importe quelle polymérase à ADN de type « Hotstart » peut être utilisée pourvu qu'elle ait démontré une sensibilité et une spécificité au moins aussi bonne que celle décrite dans Ioos *et al*. (2009) lors d'essais préliminaires effectués sur extraits d'ADN total d'isolats référencés de *G. circinata,* dans les conditions d'utilisation décrites par la présente méthode.
La polymérase à ADN doit être conservée au congélateur. La date de péremption doit être vérifiée avant utilisation, et respectée.

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 dans du Tris EDTA ="dNTPs mix" ou un tampon équivalent.

Tampon de l'ADN polymérase

Il est obligatoire d'utiliser le tampon de polymérase fourni avec cette dernière par le fabricant.

Pré-mix commercial
Mélange réactionnel prêt à l'emploi proposé par certains fournisseurs de réactifs qui contient sous forme faiblement concentrée certains réactifs nécessaires à la réalisation de master mix de PCR en temps réel : tampon de polymérase, polymérase à ADN, dNTP, $MgCl_2$, conservateurs, etc.). Certains pré-mix contiennent en outre une concentration appropriée d'Uracyl –N- glycosylase (UNG).
Il est tout à fait possible d'utiliser des pré-mix qui contiennent en plus une concentration appropriée de bases Uracile (dUTP) pouvant se substituer aux dTTP. Ces pré-mix permettent une digestion préalable de tous les produits amplifiés ayant incorporé ces dUTP par digestion à l'Uracil-N-glycosylase (UNG).
Les pré-mix commerciaux peuvent être utilisés pourvu qu'ils aient démontré d'égales performances de sensibilité et de spécificité lors d'essais préliminaires effectués sur des extraits d'ADN total d'isolats référencés de *G. circinata,* dans les conditions d'utilisation décrites par la présente méthode.

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 %.

Marqueurs de taille moléculaire

Il est recommandé d'utiliser une échelle de taille moléculaire 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 360 pb). Le mélange de marqueurs de taille moléculaire doit être utilisé 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.

Autres consommables à usage unique

- Microcônes stériles à filtre de volume adaptés
- Microtubes stériles de 2 ml
- Microtubes ou capillaires stériles pour PCR de volume adapté au thermocycleur temps réel utilisé, à paroi fine, individuels, en barrette de 4, 8 ou en plaque de 96.
- Billes de broyage stériles en acier ou en carbure de tungstène de 3 mm de diamètre.

5. Appareillage et matériel

En plus de l'appareillage courant d'un laboratoire de biologie moléculaire, le matériel suivant est jugé nécessaire pour certaines phases de l'analyse:

- Appareil de PCR en temps réel et ordinateur de pilotage capables de mesurer la fluorescence des reporteurs de type « FAM » et « JOE » ou des fluorophores de spectre équivalent
- Broyeur de tissu oscillant (de type « beadbeater ») avec adaptateur et portoirs pour tubes de 2 ml
- Hotte à flux laminaire ou poste de sécurité microbiologique pour préparation du mélange réactionnel et chargement des échantillons dans les tubes de PCR (si possible deux hottes ou postes séparés)

6. Contrôles et témoins

La technique de détection de régions cibles d'ADN d'un organisme par la technique de PCR en temps réel autorise l'utilisation d'une série de contrôles et témoins permettant de valider la bonne qualité de la manipulation. Ces contrôles et témoins ont différentes fonctions et leur utilisation permet de garantir que *i)* l'opérateur a correctement suivi le protocole, *ii)* les consommables et réactifs utilisés étaient de qualité suffisante, *iii)* les volumes prélevés par micropipettes, les températures et durées de réaction, la concentration et le pH des solutions utilisées étaient corrects, *iv)* l'extrait d'ADN était suffisant en quantité et amplifiable (pas d'interférence avec des composés inhibiteurs) et *v)* qu'il n'y a pas eu de contamination accidentelle des échantillons testés.
Les contrôles à produire au cours de l'analyse sont *a minima* les suivants :

- **Un contrôle de la qualité de l'extraction d'ADN et de la présence d'inhibiteur sera réalisé pour chaque prise d'essai.** Il prendra la forme d'un test PCR temps réel utilisant la combinaison d'amorces / sonde 18S uni -F/-R/-P. Ce test permet de générer un signal de fluorescence de nature exponentielle significativement supérieur au bruit de fond si de l'ADN de plante ou de champignon est présent dans un extrait, sans effet inhibiteur suffisant (Ioos et al. 2009). Toutefois, les prises d'essai qui sont positives pour le parasite cible ne nécessiteront pas systématiquement de contrôle de la qualité d'ADN. Ce test sera réalisé dans une autre réaction que le test de détection de *G. circinata*. L'analyse des courbes de fluorescence 18S uni-F/-R/-P se limitera aux données acquises lors des 30 premiers cycles exclusivement. Une S_{ADN} sera dite positive pour le test 18S uni si le Ct (Cycle threshold, cycle seuil) ou le Ct moyen généré est dans une gamme de Ct acceptable, préalablement déterminée expérimentalement par le laboratoire, sur ce type de matrice (Semences de *Pinus* sp.) dans ses propres conditions.
- **Un témoin négatif de processus ($T\text{-}_{PROC}$) ou un témoin négatif d'extraction ($T\text{-}_{extr.}$)** sera préparé pour toute série d'extractions. Une prise d'échantillon "vide" (= "$T\text{-}_{extr}$"), c'est à dire un microtube de 2 ml stérile vide, 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 ou par un échantillon de tissus de *Pinus* reconnu non contaminé par *G. circinata* (témoin négatif de processus, $T\text{-}_{PROC}$). L'un ou l'autre sera testé en *triplicata* lors de chaque réaction de PCR en temps réel FCIR-F/-R/-P pour vérifier l'absence de contamination croisée entre échantillons ou de contamination externe lors de la phase d'extraction d'ADN.

- **Un témoin positif T+$_{18S\ Pinus}$** sera systématiquement testé en *triplicata* lors de chaque réaction de PCR en temps réel 18S uni. Il permet de vérifier que la réaction PCR 18S uni s'est effectuée de façon correcte. Ce T+$_{18S\ Pinus}$ est constitué d'une solution calibrée de plasmides bactériens dans lesquels est clonée une cible de test PCR 18S uni-F/-R/-P à partir d'ADN d'aiguilles de *Pinus*, ou d'une solution d'ADN de tissus végétatifs de *Pinus* à une concentration similaire à ce qui est obtenu en moyenne à partir d'échantillon à analyser.
- **Un témoin positif en limite pratique de détection (T$_{+LOD}$)** sera systématiquement testé en *triplicata* lors de chaque réaction de PCR en temps réel FCIR-F/-R/-P. Il permet de vérifier que la réaction PCR s'est effectuée de façon optimale (conditions thermodynamique, volumétrique, et chimique) pour que la plus petite quantité détectable de *G. circinata* puisse avoir été détectée dans un échantillon par ce protocole. Ce T$_{+LOD}$ est constitué d'une solution calibrée d'ADN génomique d'une souche référencée de *G. circinata* ou d'une solution calibrée de plasmides bactériens dans lesquels est clonée la cible du test PCR FCIR-F/-P/-R**.** Ce T$_{+LOD}$ doit être caractérisé par le laboratoire dans ses propres conditions. En pratique, le T$_{+LOD}$ peut être défini comme la plus petite quantité de cible produisant un résultat positif dans au moins 95 % des cas, assurant ainsi un taux de faux négatif ≤5%.
- **Un témoin positif en limite de détection (T+$_{LOD}$)** sera systématiquement testé en *triplicata* lors de chaque réaction de PCR conventionnelle CIRC1A/CIRC4A. Il permet de vérifier que la réaction PCR s'est effectuée de façon optimale (conditions thermodynamique et chimique) pour que la plus petite quantité détectable de *G. circinata* puisse avoir été détectée dans un échantillon. Ce T+$_{LOD}$ est constitué d'une solution calibrée d'ADN génomique d'une souche référencée de *G. circinata* ou d'une solution calibrée de plasmides bactériens dans lesquels est clonée la cible du test PCR CIRC1A/CIRC4A. Ce T+$_{LOD}$ doit être caractérisé par le laboratoire dans ses propres conditions. En pratique, le T+$_{LOD}$ peut être défini comme la plus petite quantité de cible produisant un résultat positif dans au moins 95 % des cas, assurant ainsi un taux de faux négatif ≤5%.
- **Un témoin négatif d'amplification** (**T-** ou **NTC,** no template control) sera systématiquement introduit en *triplicata* lors de chaque réaction de PCR en temps réel FCIR-F/-R/-P et de PCR conventionnelle CIRC1A/CIRC4A. Une prise d'échantillon "eau" subira donc toutes les phases de l'analyse à partir de la préparation du mélange réactionnel de PCR pour vérifier l'absence de contamination lors de cette phase et lors du chargement des **S$_{ADN}$** dans les tubes individuels de PCR (2eme type de faux positifs).

Ces contrôles ainsi que des contrôles supplémentaires que le laboratoire peut ajouter si nécessaire sont définis par la norme XP V03-043.

L'utilisation de ces contrôles et 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 et témoins 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 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. L'homogénéité des thermocycleurs comprenant un bloc à puits doit en outre être vérifiée, lorsque ce type de machine est utilisé.

Certains des témoins utilisés dans cette méthode sont constitués de 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 d'organismes génétiquement modifiés (bactéries viables) sont toutefois soumises à agrément par la Commission du Génie Génétique.

7. Prise d'essai

Le laboratoire doit mettre en place une procédure adaptée à son environnement (locaux, infrastructures, …) visant à éviter tout risque de confusion entre échantillons et de contamination d'un échantillon par un autre.

La prise d'essai s'effectuera uniquement sur des tissus présentant des symptômes typiques d'une infection par *G. circinata* ou des symptômes douteux. En cas de suspicion d'infection latente sur jeune plant, la prise d'essai s'effectuera au dessus du niveau du collet, sous la forme d'un tronçon de la tige principale. Dans le cas d'analyse de jeunes semis, ces derniers sont rincés à l'eau courante pendant

quelques secondes afin d'éliminer tout résidu de support de culture de l'appareil racinaire, avant de procéder au prélèvement de tissu.
Les prélèvements de tissu s'effectuent dans une atmosphère stérile, en utilisant des outils coupants stérilisés. Prélever préférentiellement dans la zone du chancre ou en limite de la zone nécrosée.
Pour un échantillon donné, réaliser une prise d'essai en ciblant les régions les plus pertinentes et prélever autant de fragments que nécessaire afin de maximiser les chances de détecter le parasite.
Les fragments de tissus récupérés sont stérilisés en surface par incubation de 1 à 2 minutes dans une solution titrant environ 1.5 % de chlore actif puis rincés dans de l'eau stérile. Les fragments sont ensuite placés sur du papier filtre stérile et séchés par le flux stérile.
Les fragments de tissus sont ensuite découpés à l'aide d'une lame de scalpel stérilisée en tronçons les plus petits possible (si possible ≤ 2 à 3 mm d'arête). Ces fragments sont ensuite mélangés puis transférés dans un ou plusieurs microtubes de 2 ml en veillant à ne pas dépasser un volume de fragments d'environ 400 à 500 µl / microtube (se fier aux graduations du tube).. En règle générale, un seul tube est nécessaire, mais il est possible d'en préparer plusieurs si l'échantillon pour analyse présente des symptômes manifestement distincts. Ces microtubes individuels constitueront les prises d'essai. **A cette étape, il est recommandé de préparer un tube supplémentaire de fragments, de l'identifier et de le conserver congelé en cas de nécessité de confirmation des cas positifs par un laboratoire de référence.** Les différentes 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.

8. Etapes de l'analyse

8.1. Broyage des prises d'essai et extraction d'ADN total

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

1. Prélever deux billes de broyage, ouvrir le microtube contenant la prise d'essai et y transférer deux billes de broyage stériles
2. Ajouter le volume de tampon de lyse préconisé par le fabricant de kit d'extraction d'ADN dans chaque tube de prise d'essai
3. Pour chaque prise d'essai, tremper l'extrémité d'un cône stérile de 1000 µl sur 1 cm de profondeur dans de la poudre de PVPP et agiter ce cône nappé de PVPP dans la prise d'essai, retirer le cône, le jeter.
4. Placer le microtube sur le portoir du broyeur et broyer environ 2 minutes à une fréquence d'agitation d'environ 30 Hz. Pendant la phase de broyage, arrêter à au moins une reprise l'agitation et retourner en l'agitant ou vortexant plusieurs fois le microtube.
5. Centrifuger le microtube quelques secondes après le broyage pour faire descendre l'échantillon au fond du tube et réduire la mousse.
6. Incuber chaque tube environ 20 min à environ 65°C (ou à la température recommandée par le fabricant de kit d'extraction d'ADN). Pendant l'incubation, vortexer chaque tube à au moins une reprise pour ré-homogénéiser leur contenu qui aura tendance à précipiter.
7. A la fin de l'incubation centrifuger les tubes environ 2 min à environ 11 000 g. Prélever le surnageant pour poursuivre l'extraction.
8. Le surnageant prélevé est transféré dans un nouveau microtube stérile ou dans la première colonne de filtration du kit d'extraction d'ADN. Le microtube contenant le culot cellulaire est détruit. L'extraction d'ADN se poursuit ensuite en suivant les recommandations du fournisseur du kit d'extraction d'ADN.
9. A la fin du mode opératoire prescrit par le fabricant, l'ADN total extrait est élué dans un volume final de 100 µl de tampon d'élution. Cette solution d'ADN total constituera la solution (extrait) d'ADN directement analysée par PCR en temps réel (S_{ADN}).

8.2. Test de détection par PCR en temps réel

Préparation et distribution du mélange réactionnel de détection FCIR-F/-R/-P

La composition du mélange réactionnel (volume réactionnel de 20 µl) est la suivante :

Composé	Concentration finale
Eau Ultra Pure	qsp 20 µl
Tampon de polymérase à ADN fourni avec la polymérase à ADN	1 X
Chlorure de Magnésium	5 mM
Amorce sens « FCIR-F »	0.3 µM
Amorce antisens « FCIR-R »	0.3 µM
Sonde « FCIR-P »	0.1 µM
dNTPs mix	4 x 200 µM
Polymérase à ADN de type Hotstart	0.025 U/µl

1. Le mix se prépare dans un microtube stérile de 1.5 ou 2 ml,
2. Les différents composants, excepté la Polymérase à ADN, sont décongelés à température ambiante puis homogénéisés par vortexage.
3. Les différents composants sont ajoutés au microtube stérile à l'aide de micropipettes obligatoirement munies de microcônes stériles à embout filtre.
4. Si elle n'est pas mélangée à un prémix commercial, la polymérase à ADN est ajoutée en dernier dans le mix, en mélangeant cette dernière plusieurs fois par aspiration/refoulement dans le mélange réactionnel.
5. Le microtube contenant le mix complet doit être passé au vortex pendant au moins 5 secondes avant sa distribution.
6. Le mix est distribué dans les microtubes de PCR identifiables à raison de 18 µl par microtube.

Addition des solutions d'ADN à tester dans les microtubes de PCR

L'addition des S_{ADN} à tester ainsi que des solutions d'ADN servant de contrôles s'effectuera de préférence dans une zone physiquement séparée de la zone où se sont effectuées la préparation et la distribution du mélange réactionnel. Il est souhaitable d'utiliser un jeu de micropipettes uniquement réservé à cet effet.

1. Les différentes solutions S_{ADN} correspondant aux différentes prises d'essai sont testées en *triplicata* (3 tubes ou capillaires PCR individuels) à raison de 2 µl par microtube de PCR à l'aide d'une micropipette munie d'un microcône stérile à embout filtre.
2. Les S_{ADN} des différents contrôles sont ajoutés et testées en *triplicata* : $T-_{PROC}$, $T+_{LOD}$, etc.. Pour le T-, on substitue à la S_{ADN} 2 µl d'eau ultra pure stérile. Il est recommandé d'ajouter les témoins positifs en fin de manipulation, après avoir refermé de façon étanche les tubes correspondants aux échantillons à tester.
3. Les microtubes sont transférés dans le bloc ou le rotor du thermocycleur.

Paramètres de l'amplification par PCR en temps réel FCIR-F/-R/-P

Les différents paramètres de la PCR en temps réel pour la détection de *G. circinata* sont les suivants (Ioos et al. 2009) :

Etape		Température de consigne	Durée programmée	Nombre de cycles
1	Dénaturation initiale / activation de la polymérase Hotstart	95 °C	Suivre les préconisations du fournisseur	1
2	Dénaturation	95°C	15 sec	**40**
3	Hybridation - polymérisation	**70°C**	**55 sec puis mesure de la fluorescence**	

A la fin de l'amplification par polymérisation en chaîne, les tubes de PCR sont évacués et détruits.

Test de contrôle qualité d'ADN par PCR en temps réel 18S uni-F/-R/-P

Ce test sera réalisé en parallèle du test de détection de *G. circinata*. La composition du mélange réactionnel est identique à celui indiqué pour la recherche de *G. circinata*, en substituant simplement les

amorces et la sonde FCIR-F/-R/-P par les amorces et la sonde 18S uni -F/-R/-P. Les conditions d'amplification sont identiques à celles employées pour la recherche de *G. circinata*, mis à part la température d'hybridation/synthèse qui est fixée à 65°C et le nombre de cycles nécessaire fixé à 30. Chaque prise d'essai sera testée au minimum une fois par ce test.

Validation de l'analyse FCIR-F/-R/-P

La validation de l'analyse s'effectue en observant les courbes de fluorescence mesurées par l'appareil de PCR en temps réel et générées à partir des différents témoins.

L'opérateur détermine une ligne de seuil (« threshold line ») qui constituera la limite minimale de fluorescence « FAM » à atteindre pour qu'un signal de fluorescence émis soit significativement supérieur au signal du bruit de fond (représenté par la « base line »). La ligne de seuil se place en général à un niveau de fluorescence au moins 10 fois supérieur à celui généré par le bruit de fond et où les réplicats du $T+_{LOD}$ sont les plus proches les uns des autres. Le cycle théorique estimé à partir duquel le niveau de fluorescence généré par un échantillon franchit cette ligne seuil avec une nature exponentielle correspond au Ct.

L'analyse est considérée validée si et seulement si l'ensemble des conditions suivantes est réuni en fin de réaction :

a) Aucun des réplicats de $T-_{PROC}$ n'a généré de fluorescence « FAM » supérieure à la ligne de seuil déterminée => il n'y a pas eu de contamination croisée accidentelle pendant la phase de broyage et d'extraction d'ADN de la série des échantillons analysés.

b) Aucun des réplicats de T- (NTC) n'a généré de fluorescence « FAM » supérieure à la ligne de seuil déterminée => il n'y a pas eu de contamination accidentelle pendant la préparation du mélange réactionnel et l'ajout des S_{ADN}.

c) Les réplicats de $T+_{LOD}$ ont chacun généré un niveau de fluorescence « FAM » supérieur à la ligne de seuil déterminée => les conditions de PCR et la composition du mélange réactionnel de PCR ont permis d'amplifier spécifiquement et avec une performance optimale la séquence cible chez *G. circinata*.

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

Interprétation et formulation des résultats

Si la série d'analyse est validée, les résultats peuvent être considérés comme interprétables pour l'ensemble des S_{ADN}, donc des prises d'essai et de leur réplicats, testés au cours de la même réaction de PCR.

Pour chacune des réactions de PCR, observer le Ct du contrôle $T+_{LOD}$= Ct_{LOD}. Tous les extraits d'ADN testés lors de la réaction validée dont le Ct est inférieur à Ct_{LOD}+3 seront considérés comme positifs.

a) Si les trois réplicats d'une des prises d'essai sont positifs pour le test FCIR-F/-R/-P, la prise d'essai considérée devra être testée pour confirmation par PCR conventionnelle CIRC1A/CIRC4A

b) Si un ou deux réplicats parmi les trois d'une des prises d'essai sont positifs pour le test FCIR-F/-R/-P, refaire un test PCR FCIR-F/-R/-P en *triplicata*.

c) Si aucun des réplicats de S_{ADN} de l'ensemble des prises d'essai (S_{ADN}a, S_{ADN}b, …) n'est positif pour le test FCIR-F/-R/-P et que l'ensemble des S_{ADN} sont positives pour le test 18S uni, l'échantillon pour analyse est dit négatif pour *G. circinata*. Le résultat sera alors exprimé par une phrase du type « Résultat négatif pour la détection de *G. circinata* dans l'échantillon analysé» en citant la méthode ci-décrite et en précisant le seuil de détection de la méthode[1].

d) Si aucun des réplicats de l'ensemble des S_{ADN} de l'une des prises d'essais n'est positif pour le test FCIR-F/-R/-P et que la S_{ADN} correspondante est aussi négative pour le test 18S uni, la ou les prises d'essai sont dites « non utilisable(s) » pour la recherche de *G. circinata*. Ce cas de figure traduit i) une mauvaise extraction de l'ADN total de la prise d'essai considérée, ou ii) une présence trop importante de composés à effet inhibiteur dans S_{ADN}. Dans le premier cas i), il faudra vérifier qu'une quantité suffisante d'ADN a été extraite pour chacune des prises d'essai par dosage au spectrophotomètre ou par électrophorèse sur gel. Si ce n'est pas le cas, l'extraction d'ADN n'a pas été correctement réalisée et une nouvelle prise d'essai sera réalisée si la taille de l'échantillon le permet. Dans le deuxième cas ii), une dilution de la S_{ADN} doit être analysée pour tenter de diminuer l'effet inhibiteur. Si l'effet inhibiteur ne peut être levé, le résultat sera alors

[1] Le seuil de détection est soit celui de la méthode globale s'il a pu être déterminé, soit celui de la réaction d'amplification par PCR ($T+_{LOD}$). Dans les deux cas le seuil doit être déterminé expérimentalement par le laboratoire, dans ses propres conditions

exprimé par « résultat indéterminé » selon la méthode ci décrite, et mentionner la cause de l'indétermination.

Le diagramme décisionnel présenté en annexe I résume ces conditions.

8.3. Test de confirmation par PCR conventionnelle

Préparation et distribution du mélange réactionnel de PCR conventionnelle CIRC1A/CIRC4A
La composition du mélange réactionnel (volume réactionnel de 25 µl) est la suivante :

Composé	*Concentration finale*
Eau Ultra Pure	qsp 25 µl
Tampon de polymérase à ADN fourni avec la polymérase à ADN	1 X
Chlorure de Magnésium	2 mM
Amorce sens « CIRC1A »	0.5 µM
Amorce antisens « CIRC4A »	0.5 µM
dNTPs mix	4 x 250 µM
Polymérase à ADN de type « Hotstart »	0.05 U/µl

1. Le mix se prépare dans un microtube stérile de 1.5 ou 2 ml.
2. Les différents composants, excepté la Polymérase à ADN, sont décongelés sur la paillasse à température ambiante puis homogénéisés par vortexage.
3. Les différents composants sont ajoutés au microtube stérile à l'aide de micropipettes obligatoirement munies de microcônes stériles à embout filtre.
4. La polymérase à ADN est ajoutée en dernier dans le mix
5. Le microtube contenant le mix complet doit être passé au vortex pendant 10 secondes avant sa distribution.
6. Le mix est distribué à raison de 18.75 µl par tube dans les microtubes de PCR placés dans de la glace pilée.

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

1. Les différentes solutions S_{ADN} correspondant aux différentes prises d'essai à confirmer sont testées en *triplicata* (3 tubes ou capillaires PCR individuels) à l'aide d'une micropipette munie d'un microcône stérile à embout filtre, à raison de 6.25 µl de solution par microtube de PCR.
2. Les S_{ADN} des différents contrôles sont ajoutés et testés par au moins une PCR : $T+_{LOD}$ et T-.
3. Les microtubes sont ensuite refermés de façon étanche et transférés dans le bloc ou le rotor du thermocycleur

Amplification par PCR CIRC1A/CIRC4A
Les différents paramètres de la PCR conventionnelle pour la détection de *G. circinata* sont les suivants (Schweigkofler et al. 2004) :

Etape		**Température de consigne**	**Durée programmée**	**Nombre de cycles**
1	Dénaturation initiale	95 °C	Suivre les préconisations du fournisseur	1
2	Dénaturation	95°C	35 sec	**45**
	Hybridation	**66°C**	55 sec	
	Polymérisation d'ADN	72 °C	50 sec	
3	Elongation finale	72°C	12 min	1

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

Il est obligatoire de manipuler les produits post PCR (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).
Les produits de PCR de confirmation CIRC1A/CIRC4A seront séparés par électrophorèse sur un gel d'agarose à environ 1%, en parallèle avec un marqueur de taille moléculaire.
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.
Après l'électrophorèse, le gel est incubé dans une cuve contenant une solution de bromure d'éthidium de concentration appropriée puis placé sur un transilluminateur à UV en veillant à ne pas exposer le manipulateur au rayonnement.
Il est obligatoire d'effectuer une prise de vue du gel exposé aux UV et de la sauvegarder sous forme d'impression ou fichier informatique pour l'analyse et l'archivage des résultats. La prise de vue devra s'effectuer rapidement, car l'ADN est dégradé lors d'une exposition prolongée aux UV.

Validation de l'analyse CIRC1A/CIRC4A
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 est réuni :

- Le T- ne présente aucun fragment amplifié de 360 pb visible => il n'y a pas eu de contamination accidentelle pendant la préparation du mix et l'ajout des S_{ADN}.
- Le $T+_{LOD}$ présente un fragment amplifié visible et de taille attendue (environ 360 paires de bases) => L'amplification du $T+_{LOD}$ 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, etc.) pour permettre la détection de la plus petite quantité détectable de *G. circinata.*

Dans le cas où au moins une condition ne serait pas respectée, l'analyse n'est pas validée et selon le type d'anomalie observée, tout ou partie de l'analyse est à refaire.

Résultats pour les échantillons
Si l'analyse est validée, les résultats peuvent être considérés comme interprétables pour l'ensemble des S_{ADN}, donc des prises d'essai, testées au cours du même test PCR.

a) Si pour une S_{ADN} cible testée par PCR CIRC1A/CIRC4A, les trois réplicats génèrent un fragment amplifié de taille attendue (environ 360 pb), la prise d'essai est dite positive pour *G. circinata.* Le résultat sera exprimé par une phrase du type **« Présence de *G. circinata*»** dans l'échantillon analysé en citant la méthode ci-écrite.
b) Si pour une S_{ADN} cible testée par PCR CIRC1A/CIRC4A, seuls un ou deux réplicats génèrent un fragment amplifié de taille attendue (environ 360 pb), le test PCR est à refaire à nouveau en *triplicata*. Si à nouveau seuls un ou deux réplicats génèrent un fragment amplifié de taille attendue (environ 360 pb), le résultat sera considéré comme douteux, et des analyses complémentaires pourront être mises en œuvre (e.g. analyse de la séquence de l'amplicon).
c) Si pour une S_{ADN} cible testée par PCR CIRC1A/CIRC4A aucun des réplicats ne génère de fragment amplifié ou qu'il n'a pas la taille attendue, la prise d'essai est dite négative pour *G. circinata.* Si l'ensemble des prises d'essai est négartif pour un échantillon donné, le résultat sera exprimé par une phrase du type « **Résultat négatif pour la détection de *G. circinata*** » dans l'échantillon analysé en citant la méthode ci-décrite et en précisant le seuil de détection de la méthode.

Le diagramme décisionnel présenté en annexe I résume ces conditions.

9. Résultats

9.1. Validation de l'analyse

Les tests de PCR en temps réel FCIR-F/-R/-P et de PCR conventionnelle CIRC1A/CIRC4A doivent être validés indépendamment selon les critères énoncés aux §82 et §83.

9.2. Interprétation et formulation des résultats

La formulation des résultats doit se faire conformément au §82 ou au §83 pour les résultats négatifs et au §83 pour les résultats positifs.

Le diagramme décisionnel présenté en annexe I résume l'ensemble de ces conditions.

10. Élimination des matériels susceptibles d'être contaminants

Le laboratoire doit mettre en œuvre des mesures prenant en compte ces risques pour garantir la non dissémination de l'organisme nuisible dans l'environnement.
Les tubes et autres consommables plastiques ayant été utilisés pendant la phase d'extraction – purification d'ADN total peuvent être éliminés sans traitement particulier (plus de parasite viable à ce stade).
Les tubes et autres consommables plastiques ayant été utilisés lors de la phase de préparation du mix et chargement des S_{ADN} peuvent être éliminés sans traitement particulier.

11. Conservation des reliquats de matériels utilisés

Sauf mention contraire explicite ou impossibilité technique avérée, les laboratoires doivent conserver les reliquats pertinents (nature, quantité et qualité) de matériel soumis à analyse, dans des conditions appropriées garantissant leur intégrité, jusqu'à au moins le dixième jour ouvrable suivant l'envoi au demandeur d'un rapport d'analyse concluant à la non mise en évidence de l'organisme recherché. Ce délai imposé est destiné à laisser le temps au demandeur de l'analyse de contester le résultat auprès du laboratoire (ce qui prolonge la conservation du reliquat jusqu'à l'issue de la contestation) et éventuellement de demander une analyse contradictoire.
Dans le cas d'un résultat autre que la non mise en évidence de l'organisme recherché, et sauf indications plus précises dans la méthode, l'ensemble des reliquats pertinents doit être conservé pendant une durée minimale de 12 mois, sauf pour les parties éventuellement transmises à un autre laboratoire agréé ou de référence, à qui est alors transférée la charge de conservation des reliquats. Le laboratoire national de référence peut demander que tout ou partie de ces reliquats lui soient transmis, aux frais des laboratoires agréés ou reconnus, dans le cadre des missions qui lui sont confiées.

LISTE DES DOCUMENTS OFFICIELS APPELES PAR LA METHODE

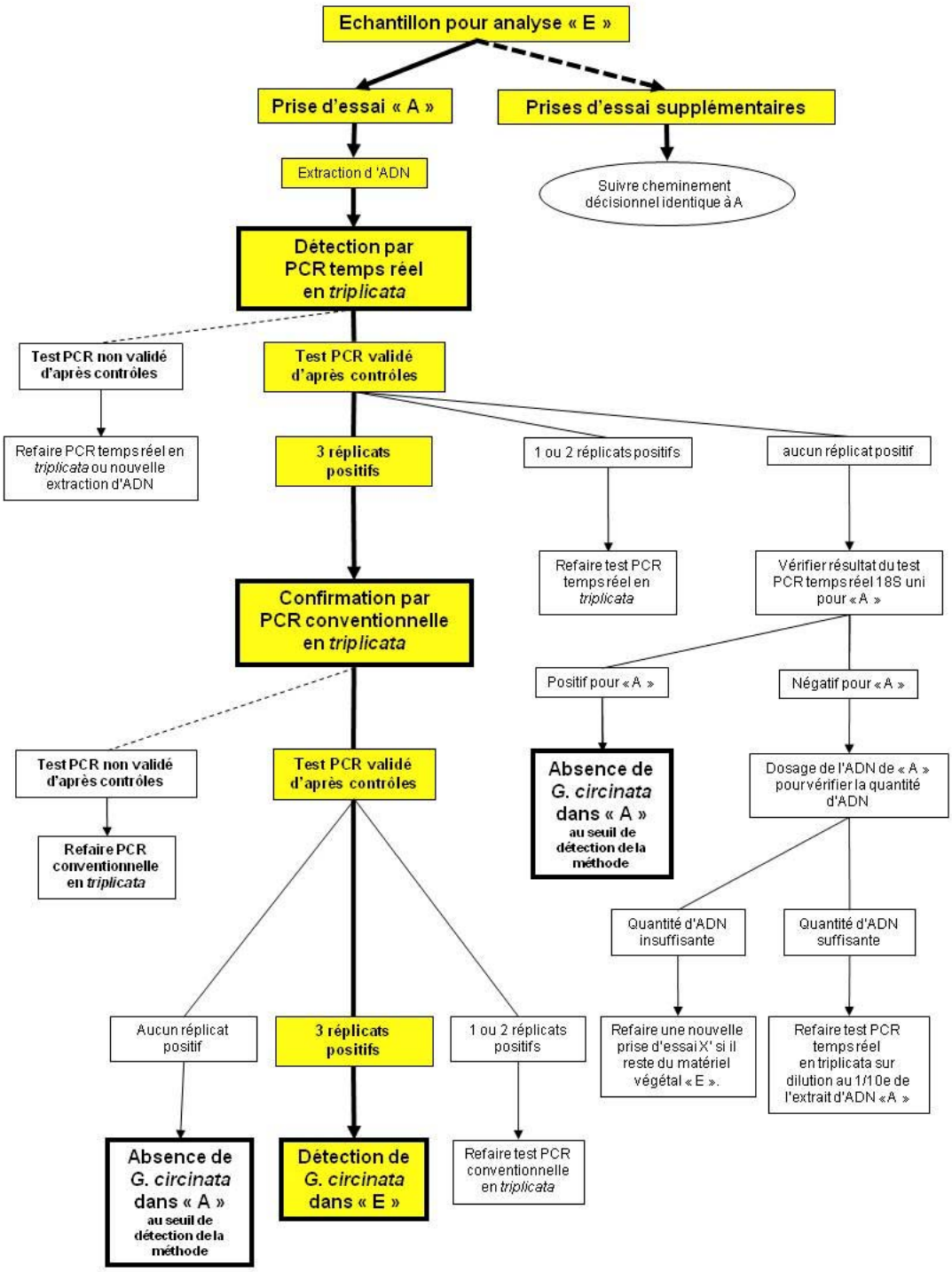
Référence	Titre
Décret 2006-7 du 4 janvier 2006	Décret 2006-7 du 4 janvier 2006 relatif aux laboratoires nationaux de référence, ainsi qu'à l'agrément et à la reconnaissance des laboratoires d'analyses dans le domaine de la santé publique vétérinaire et de la protection des végétaux, et modifiant le code rural
Arrêté ministériel du 19 décembre 2007	Arrêté ministériel du 19 décembre 2007 fixant les conditions générales d'agrément des laboratoires d'analyses dans le domaine de la santé publique vétérinaire et de la protection des végétaux
Norme XP V03 - 043	Exigences générales pour la réalisation d'analyses utilisant la biologie moléculaire pour la détection et l'identification d'organismes pathogènes, d'altération et ravageurs des végétaux et produits dérivés
Dossier d'évaluation Gcircinata_2010	Développement, évaluation et validation de 3 méthodes de détection du champignon *Gibberella circinata* sur tissus végétatifs et semences de *Pinus* spp. et *Pseudotsuga menziesii*
REP 001	Répertoire des recettes en vigueur au LNPV
GLO 001	Glossaire des termes techniques en vigueur au LNPV

BIBLIOGRAPHIE SUCCINCTE

Ioos R, Fourrier C, Iancu G, Gordon TR, 2009. Sensitive Detection of *Fusarium circinatum* in Pine Seed by Combining an Enrichment Procedure with a Real-Time Polymerase Chain Reaction Using Dual-Labeled Probe Chemistry. *Phytopathology* 99, 582-590.

Schweigkofler W, O'Donnell K, Garbelotto M, 2004. Detection and quantification of airborne conidia of *Fusarium circinatum*, the causal agent of pine pitch canker, from two California sites by using a real-time PCR approach combined with a simple spore trapping method. *Applied And Environmental Microbiology* 70, 3512-3520.

ANNEXE I


Echantillon pour analyse « E »
Prise d'essai « A »
Prises d'essai supplémentaires
Extraction d 'ADN
Suivre cheminement décisionnel identique à A
Détection par PCR temps réel en triplicata
Test PCR non validé d'après contrôles
Test PCR validé d'après contrôles
Refaire PCR temps réel en triplicata ou nouvelle extraction d'ADN
3 réplicats positifs
1 ou 2 réplicats positifs
aucun réplicat positif
Refaire test PCR temps réel en triplicata
Vérifier résultat du test PCR temps réel 18S uni pour « A »
Confirmation par PCR conventionnelle en triplicata
Positif pour « A »
Négatif pour « A »
Test PCR non validé d'après contrôles
Test PCR validé d'après contrôles
Absence de G. circinata dans « A » au seuil de détection de la méthode
Dosage de l'ADN de « A » pour vérifier la quantité d'ADN
Refaire PCR conventionnelle en triplicata
Quantité d'ADN insuffisante
Quantité d'ADN suffisante
Aucun réplicat positif
3 réplicats positifs
1 ou 2 réplicats positifs
Refaire une nouvelle prise d'essai X' si il reste du matériel végétal « E ».
Refaire test PCR temps réel en triplicata sur dilution au 1/10e de l'extrait d'ADN « A »
Absence de G. circinata dans « A » au seuil de détection de la méthode
Détection de G. circinata dans « E »
Refaire test PCR conventionnelle en triplicata

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

Laboratoire national de la protection des végétaux,
7 rue Jean Dixméras, 49044 ANGERS cedex 01
lnpv.sdqpv.dgal@agriculture.gouv.fr

Ce document est édité par :

Ministère de l'alimentation, de l'agriculture et de la pêche
Direction générale de l'alimentation
Service de la prévention des risques sanitaires de la production primaire
Sous-direction de la qualité et de la protection des végétaux
251 rue de Vaugirard, 75732 PARIS Cedex 15
www.agriculture.gouv.fr

auprès de qui toute autre correspondance peut être adressée.

Liberté • Égalité • Fraternité
RÉPUBLIQUE FRANÇAISE

MINISTÈRE
DE L'ALIMENTATION
DE L'AGRICULTURE
ET DE LA PÊCHE

METHODE OFFICIELLE D'ANALYSE

Détection de *Gibberella circinata*

Réf. : MOA 003 Partie B version 1a

Droits de reproduction et Copyright

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

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

Dates de validité du présent document

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

Cependant, et sauf indication contraire explicite, la version précédente peut encore être utilisée pendant une durée maximale de 15 mois à compter de la date de publication de la nouvelle version, afin de tenir compte des cycles d'accréditation auxquels sont soumis les laboratoires de référence, agréés et reconnus officiellement.

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

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

MOA 003	Consultation publique		Validité	
Numéro de la version	Début	Fin	Début	Fin
Version 1a	Mars 2010	Juin 2011	Mars 2010	

SOMMAIRE

PREAMBULE **5**

Objet des méthodes officielles 5
Glossaire, abréviations et documents connexes 5
Limites imposées aux laboratoires agréés ou reconnus 5
Échantillonnage et échantillon 5
Modification des méthodes officielles 5
Considérations d'ordre métrologique 6
Obligations réglementaires et limites de responsabilité 6
Revue des méthodes officielles, amendement et modification 7

ORIGINE DE LA METHODE ET REMERCIEMENTS **8**

PRINCIPALES MODIFICATIONS PAR RAPPORT A LA VERSION PRECEDENTE **9**

Modifications 9
Améliorations 9

DESCRIPTION DE LA METHODE **10**

1. Objet. 10
2. Domaine d'application. 10
3. Présentation schématique de la détection 12
4. Produits et consommables 12
   4.1. Tampons 13
   4.2. Autres réactifs et consommables 13
5. Appareillage et matériel 15
6. Contrôles et témoins 15
7. Prise d'essai 16
8. Etapes de l'analyse 17
   8.1. Enrichissement biologique et broyage des prises d'essai 17
   8.2. Extraction d'ADN total 17
   8.3. Test de détection par PCR en temps réel 18
   8.4. Test de confirmation par PCR conventionnelle 20
9. Résultats 22
   9.1. Validation de l'analyse 22
   9.2. Interprétation et formulation des résultats 22
10. Élimination des matériels susceptibles d'être contaminants 22
11. Conservation des reliquats de matériels utilisés 22

LISTE DES DOCUMENTS OFFICIELS APPELES PAR LA METHODE **23**

BIBLIOGRAPHIE SUCCINCTE **24**

ANNEXE I **25**

ANNEXE II **26**

PREAMBULE

OBJET DES METHODES OFFICIELLES

Les méthodes officielles, au sens du décret 2006-7 du 4 Janvier 2006, sont les méthodes validées par le ministère chargé de l'agriculture pour l'utilisation dans le cadre des actes officiels relevant de ses services (plans de contrôle et de surveillance, contrôles à l'importation et à l'exportation…). Ces méthodes concernent le diagnostic, la détection ou l'identification d'organismes nuisibles aux cultures, d'organismes envahissants ou d'organismes génétiquement modifiés pour le domaine d'application précisé dans la méthode.
Ces méthodes servent de « méthodes publiées » au sens de la norme ISO 17025 pour l'accréditation des laboratoires par le COFRAC.

GLOSSAIRE, ABREVIATIONS ET DOCUMENTS CONNEXES

Afin de limiter les problèmes d'interprétation des termes employés, le vocabulaire utilisé dans les méthodes officielles du ministère chargé de l'agriculture est issu des normes, guides ou glossaires nationaux ou internationaux appropriés (AFNOR, ISO, CIPV, OEPP…).
Le glossaire GLO-001 reprend les principales définitions. L'attention des lecteurs est attirée sur le fait que les termes intégrés au glossaire ne sont, en règle générale, pas spécifiquement repérés dans le corps des méthodes officielles.
Certains documents (composition de milieux et tampons…) peuvent être communs à plusieurs méthodes officielles. Pour faciliter leur harmonisation et leur mise à jour, ils sont rassemblés dans des recueils spécifiques, considérés comme faisant partie intégrante des méthodes officielles. Les méthodes officielles appellent alors ces documents spécifiques en donnant leur code tel que repris dans les recueils.

LIMITES IMPOSEES AUX LABORATOIRES AGREES OU RECONNUS

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

ECHANTILLONNAGE ET ECHANTILLON

L'échantillonnage, est de la responsabilité des préleveurs et ses modalités sont définies par ailleurs.
L' échantillon reçu est réputé être homogène en l'état de sa réception, par contre, il n'est pas forcément représentatif du lot d'où il provient et le laboratoire ne pourra en aucune façon attester du caractère représentatif au sens de la statistique.
Le laboratoire peut être amené à séparer l'échantillon reçu en sous-échantillons pour les besoins de l'analyse, il s'agit alors d'une simple division et non d'un réel sous-échantillonnage au sens de la statistique, et le laboratoire n'a pas de ce fait à être accrédité pour l'échantillonnage.

MODIFICATION DES METHODES OFFICIELLES

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

Une méthode dérivée résulte de modifications de portées limitées appliquées à la méthode officielle (par exemple, remplacement d'une procédure d'extraction de l'ADN par une autre, utilisation d'un appareil de préparation de l'échantillon différent de celui prévu dans la méthode officielle…).
Une méthode alternative s'appuie sur des principes ou des technologies différentes de celles décrites dans les méthodes officielles, il s'agit réellement d'une autre méthode.
Un réactif-clé est un réactif directement impliqué dans la reconnaissance des organismes recherchés.
Les laboratoires agréés évaluent les conséquences de la modification (d'une méthode par une autre ou d'un réactif-clé par un autre) conformément aux prescriptions du LNR et transmettent le dossier d'évaluation correspondant au LNR pour validation de cette modification.

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

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

CONSIDERATIONS D'ORDRE METROLOGIQUE

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

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

OBLIGATIONS REGLEMENTAIRES ET LIMITES DE RESPONSABILITE

La mise en œuvre des méthodes officielles s'applique sans préjudice des réglementations françaises et communautaires ou des exigences normatives auxquelles doivent se soumettre les laboratoires (circulation, détention, manipulation des organismes nuisibles, détention des substances réglementées, bonnes pratiques de laboratoire, santé et sécurité au travail, mesures de confinement, agrément des laboratoires, déclaration à la commission de génie génétique …).
Dans un certain nombre de cas, les méthodes peuvent appeler l'attention des lecteurs sur des risques potentiels liés par exemple à la dangerosité de certains produits ou à la rupture du confinement. Ces mises en garde ne sont destinées qu'à aider les lecteurs et n'ont vocation ni à être exhaustives, ni à se substituer aux exigences réglementaires existantes.
Toute personne physique ou morale constatant la présence, sur un végétal, une partie de végétal ou un produit d'origine végétale, d'un organisme nuisible réglementé a l'obligation d'en faire déclaration auprès des services régionaux de l'alimentation des directions régionales de l'alimentation, de l'agriculture et de la forêt.

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

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

REVUE DES METHODES OFFICIELLES, AMENDEMENT ET MODIFICATION

Les méthodes officielles sont revues périodiquement à l'initiative du ministère chargé de l'agriculture ou du laboratoire national de référence. A chaque modification, le code de la méthode change comme indiqué au chapitre « principales modifications par rapport à la version précédente ».
Les usagers sont également invités à faire connaître dans les meilleurs délais leurs remarques, commentaires et suggestions, et à signaler toute erreur, omission ou imprécision constatées.

ORIGINE DE LA METHODE ET REMERCIEMENTS

La présente version de la méthode a été rédigée en se basant sur les résultats d'un projet de recherche mené par le Laboratoire National de la Protection des Végétaux (station de mycologie, Nancy) visant à mettre au point une technique moléculaire de détection du champignon *Gibberella circinata* (Ioos et al. 2009). Elle a bénéficié de la collaboration de T. Gordon (University of California, Davis)

La présente méthode a été mise au point, optimisée et évaluée par la station de mycologie du LNPV.
Le travail de relecture et de revue documentaire a été effectué par le pôle développement de méthodes du LNPV, le bureau des semences et de la santé des végétaux et le département santé des forêts du Ministère chargé de l'alimentation, de l'agriculture et de la pêche.

PRINCIPALES MODIFICATIONS PAR RAPPORT A LA VERSION PRECEDENTE

MODIFICATIONS

Sans objet (première version publiée).

AMELIORATIONS

Sans objet (première version publiée).

DESCRIPTION DE LA METHODE

Détection de *Gibberella circinata* Nirenberg & O'Donnell (anamorphe *Fusarium circinatum* Nirenberg & O'Donnell) dans une matrice de graines par les techniques d'amplification par polymérisation en chaîne en temps réel et conventionnelle

1. Objet.

Gibberella circinata Nirenberg & O'Donnell (anamorphe *Fusarium circinatum* Niremberg & O'Donnell ; Syn *F. subglutinans* [Wollenweb and Reinking] Nelson, Toussoun and Marasas f. sp. *pini*) est un important agent pathogène des *Pinus* spp. et de *Pseudotsuga menziesii* qui cause des chancres résineux sur arbres adultes et pourritures racinaires ou mortalité chez les jeunes semis. Les graines et les jeunes plants infectés de *Pinus* spp. et de *Pseudotsuga menziesii* peuvent véhiculer le parasite de régions infectées vers des régions saines.

L'objet de cette méthode est de détecter la présence de *G. circinata* dans un lot de graines par le biais d'un test de détection par PCR (Polymerase Chain Reaction) en temps-réel suivi d'un test de confirmation des positifs par PCR conventionnelle, qui ciblent chacun des régions spécifiques distinctes du génome de cette espèce.
Ces méthodes sont qualitatives, elles permettent de détecter *G. circinata* dans la limite du seuil de détection de la technique employée sans objectif de quantification.
Les échantillons pour lesquels une réponse négative est obtenue sont considérés comme indemnes de *G. circinata* ou contaminés à un niveau trop faible pour être mis en évidence par la technique utilisée.

La fréquence d'infection des semences par *G. circinata* peut être relativement faible et les semences infectées ne présentent pas de symptôme. La méthode utilisée permet de traiter un grand nombre de graines simultanément par enrichissement biologique suivi par une amplification par polymérisation en chaîne en temps réel (real-time PCR) et d'un test de confirmation des positifs par un test PCR conventionnelle. L'utilisation d'amorces et d'une sonde marquée, dont la combinaison est spécifique de *G. circinata*, permet de détecter et d'amplifier des portions discriminantes de l'ADN génomique de ce champignon. La détection s'effectue dans un extrait d'ADN total obtenu à partir de prises d'essai de graines broyées dans un milieu d'enrichissement.

Les portions d'ADN détectées et amplifiées (par PCR temps réel et PCR) sont situées dans deux régions différentes d'un espaceur intergénique de l'ADN ribosomique du génome de *G. circinata*. L'utilisation de deux tests complémentaires de même sensibilité s'avère particulièrement importante pour sécuriser la spécificité de détection de *G. circinata* car de nombreuses espèces de *Fusarium* phylogénétiquement proches (y compris non formellement décrites) de *F. circinatum* peuvent être présentes dans les mêmes matrices. A ce titre, le séquençage d'un des deux produits positifs de PCR peut éventuellement permettre de confirmer avec certitude l'identité de ce dernier.

Le test basé sur la PCR en temps réel est plus adapté à des analyses de série et sera utilisé comme test de détection, tandis que le test basé sur la PCR conventionnelle sera utilisé comme test de confirmation des positifs obtenus par PCR en temps réel. Ces techniques permettent de détecter l'organisme cible quel que soit son état physiologique.

2. Domaine d'application.

Objets susceptibles d'être soumis à analyse.

Cette méthode concerne uniquement les semences de *Pinus* spp. et *Pseudotsuga menziesii*. 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

Limitations relatives aux objets susceptibles d'être soumis à analyse.
Cette méthode a été mise au point et validée sur des semences de *Pinus* spp et *Pseudotsuga menziesii* sans enrobage phytosanitaire. L'effet d'un éventuel enrobage sanitaire sur la qualité de l'analyse utilisant cette méthode est inconnu et tout résultat d'analyse sur ce genre de semence devra faire l'objet d'un avertissement.

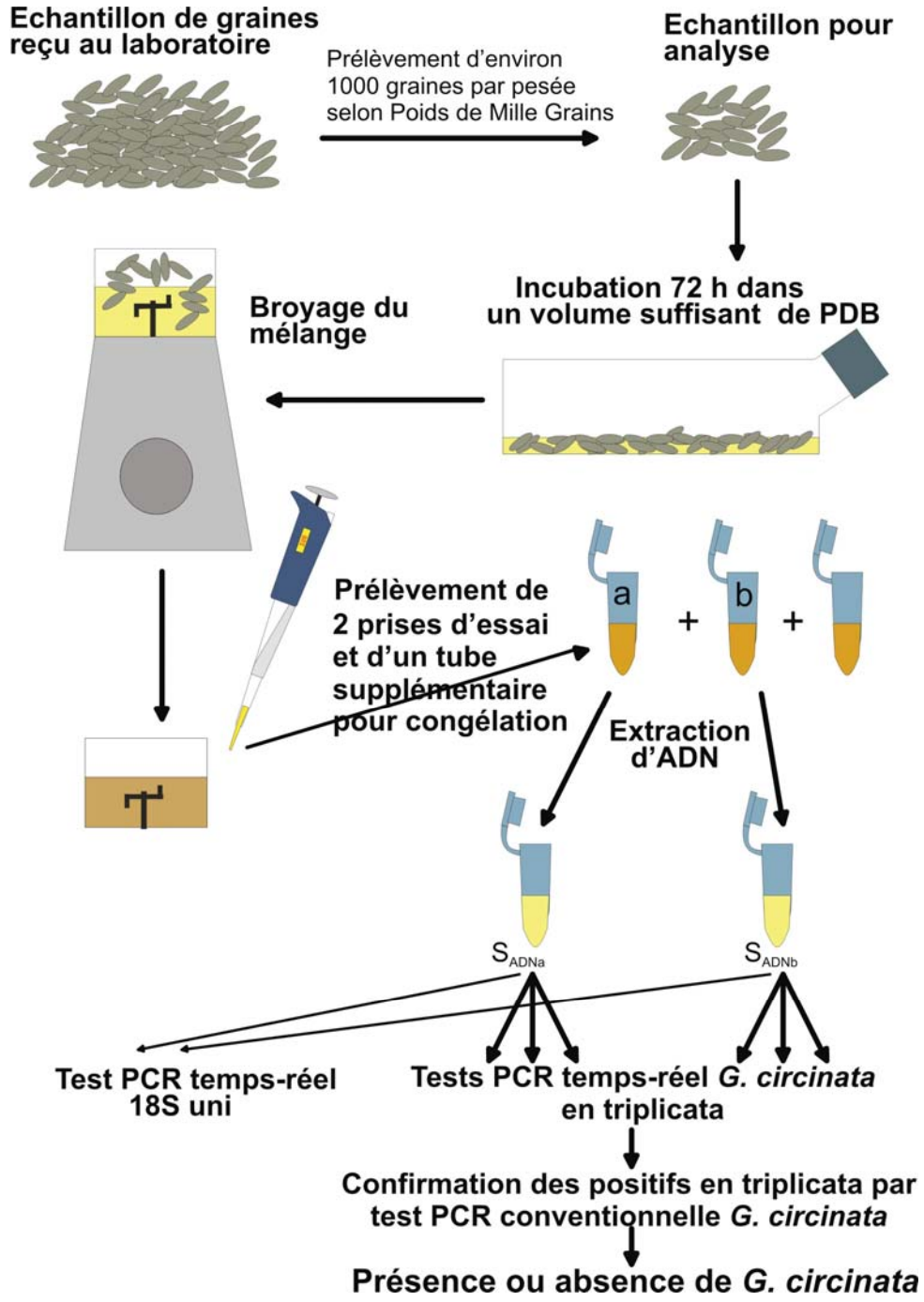
Grandeur de l'objet soumis à analyse.
La taille de l'échantillon de graines reçu au laboratoire pour recherche de *G. circinata* doit dans la mesure du possible permettre le prélèvement d'un échantillon pour analyse d'environ 1000 graines.
Dans le cas où l'échantillon reçu au laboratoire ne permet pas le prélèvement d'environ 1000 graines (cas des essences à poids de mille grains très élevé comme le *Pinus pinea* par exemple), l'ensemble de l'échantillon reçu sera pesé (si poids non indiqué) et utilisé comme échantillon pour analyse. Le rapport d'essai mentionnera dans ce cas que l'analyse n'a pu être réalisée que sur X g de graines (< 1000 graines) et que le résultat de l'analyse doit être interprété en conséquence.

Précaution(s) particulière(s) à prendre.
Le délai maximum entre la réception de l'échantillon et le début effectif de l'analyse doit être inférieur à 21 jours. L'échantillon devra pendant ce temps être conservé à 5±3°c.

Après extraction d'ADN les extraits peuvent être conservés congelés pendant 1 an.

L'exigence de confinement pour la manipulation de formes viables de cet agent pathogène à dissémination aérienne doit être de type NS3, dans la mesure où le laboratoire d'analyse est situé en zone indemne.

3. Présentation schématique de la détection



4. Produits et consommables

En règle générale, le manipulateur doit veiller (par l'utilisation de produits et consommables certifiés, nettoyage, stérilisation ou tout autre traitement approprié) à l'absence dans l'eau, produits et consommables utilisés, de contamination (ADN ou ARN), de nucléase, d'inhibiteur ou de tout autre élément pouvant interférer sur le résultat.

Les recommandations des fournisseurs, concernant les conditions de stockage avant utilisation, seront suivies, ainsi que la conservation en cours d'utilisation. A défaut le laboratoire définira les conditions qu'il jugera les plus optimales.

4.1. Tampons

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

Tris EDTA (10 mM Tris HCl, pH 8, 1 mM EDTA pH 8) :
- 10 mM Tris HCl, pH 8
- 1 mM EDTA, pH 8

A défaut il est possible d'utiliser le tampon d'élution fourni avec un kit d'extraction d'ADN de plante du commerce.

Tampon Tris Borate EDTA (TBE)

Il est recommandé d'utiliser des solutions commerciales prêtes à l'emploi ou à diluer à la concentration d'utilisation fixée à 0.5X

4.2. Autres réactifs et consommables

Eau de qualité Ultra Pure
L'eau ultra pure (EUP) doit présenter une qualité suffisante pour une utilisation en biologie moléculaire.

Eau de Javel ou solution d'hypochlorite de Sodium titrant au moins 1.5 % de chlore actif [produit corrosif à manipuler avec précaution]

Milieu liquide Potato Dextrose broth (PD broth)
Le PD broth est reconstitué à partir d'une poudre prête à l'emploi (2% de dextrose et 0.4% d'amidon de pomme de terre en concentration finale) en suivant les recommandations du fournisseur, puis stérilisé par autoclavage.

Kits d'extraction d'ADN de plante
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 d'un mini kit d'extraction d'ADN de plante disponible dans le commerce. Le type de kit d'extraction choisi est de préférence celui validé dans Ioos *et al*. (2009) ou doit avoir démontré une efficacité au moins équivalente à ce dernier. Un protocole d'extraction interne au laboratoire peut aussi être utilisé (ex. CTAB/ Phénol-Chloroforme), mais les critères de performance de la méthode globale ainsi modifiée devront être au moins équivalents à ceux de la présente méthode.

Oligonucléotides

Cible	Amorce ou sonde	Sequence (5'-3')
G. circinata	FCIR-F[a]	TCGATGTGTCGTCTCTGGAC
	FCIR-R[a]	CGATCCTCAAATCGACCAAGA
	FCIR-P[a]	[6-FAM]-CGAGTCTGGCGGGACTTTGTGC-[BHQ1]
Plante/champignon	18S uni-F[a]	GCAAGGCTGAAACTTAAAGGAA
	18S uni-R[a]	CCACCACCCATAGAATCAAGA
	18S uni-P[a]	[JOE]-ACGGAAGGGCACCACCAGGAGT-[BHQ1]
G. circinata	CIRC1A[b]	CTTGGCTCGAGAAGGG
	CIRC4A[b]	ACCTACCCTACACCTCTCACT

[a] (Ioos et al. 2009)
[b] (Schweigkofler et al. 2004))

Les solutions mères de chacune de ces amorces sont conservées au congélateur à une concentration de 100 µM dans du tampon Tris EDTA (**TE)** ou un tampon équivalent.

Des parties aliquotes de ces solutions mères sont diluées à 30 µM dans de l'eau ultra pure pour les amorces et à 10 µM dans de l'eau ultra pure pour les sondes marquées. Ces parties aliquotes sont utilisées pour la préparation du mélange réactionnel de PCR.
Les sondes marquées, sous forme concentrée ou diluée sont conservées et manipulées en évitant une trop longue et trop intense exposition à la lumière, ou en les protégeant de cette dernière (risque de photolyse). D'autres fluorophores rapporteurs peuvent être utilisés pour chaque sonde, sous réserve que le fluorophore extincteur associé soit adapté.

ADN polymérase thermostable

N'importe quelle polymérase à ADN de type « Hotstart » peut être utilisée pourvu qu'elle ait démontré une sensibilité et une spécificité au moins aussi bonne que celle décrite dans Ioos *et al*. (2009) lors d'essais préliminaires effectués sur extraits d'ADN total d'isolats référencés de *G. circinata,* dans les conditions d'utilisation décrites par la présente méthode.
La polymérase à ADN doit être conservée au congélateur. La date de péremption doit être vérifiée avant utilisation, et respectée.

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 dans du Tris EDTA ="dNTPs mix" ou un tampon équivalent.

Tampon de l'ADN polymérase

Il est obligatoire d'utiliser le tampon de polymérase fourni avec cette dernière par le fabricant.

Pré-mix commercial
Mélange réactionnel prêt à l'emploi proposé par certains fournisseurs de réactifs qui contient sous forme faiblement concentrée certains réactifs nécessaires à la réalisation de master mix de PCR en temps réel : tampon de polymérase, polymérase à ADN, dNTP, $MgCl_2$, conservateurs, etc.). Certains pré-mix contiennent en outre une concentration appropriée d'Uracyl –N- glycosylase (UNG).
Il est tout à fait possible d'utiliser des pré-mix qui contiennent en plus une concentration appropriée de bases Uracile (dUTP) pouvant se substituer aux dTTP. Ces pré-mix permettent une digestion préalable de tous les produits amplifiés ayant incorporé ces dUTP par digestion à l'Uracil-N-glycosylase (UNG).
Les pré-mix commerciaux peuvent être utilisés pourvu qu'ils aient démontré d'égales performances de sensibilité et de spécificité lors d'essais préliminaires effectués sur des extraits d'ADN total d'isolats référencés de *G. circinata,* dans les conditions d'utilisation décrites par la présente méthode.

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 %.

Marqueurs de taille moléculaire

Il est recommandé d'utiliser une échelle de taille moléculaire 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 360 pb). Le mélange de marqueurs de taille moléculaire doit être utilisé 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.

Autres consommables à usage unique

- Flacons plats de culture cellulaire en plastique, stériles et à usage unique ou stérilisables de volume et surface adaptée aux types de graines analysées. Des sachets plastiques neufs et robustes de taille adaptée peuvent être toutefois utilisés pour l'incubation de graines de taille très importante (ex. *P. pinea*)
- Microcônes stériles à filtre de volume adaptés
- Microtubes stériles de 2 ml
- Microtubes ou capillaires stériles pour PCR de volume adapté au thermocycleur temps réel utilisé, à paroi fine, individuels, en barrette de 4, 8 ou en plaque de 96.

5. Appareillage et matériel

En plus de l'appareillage courant d'un laboratoire de biologie moléculaire, le matériel suivant est jugé nécessaire pour certaines phases de l'analyse:

- Appareil de PCR en temps réel et ordinateur de pilotage capables de mesurer la fluorescence des reporteurs de type « FAM » et « JOE » ou des fluorophores de spectre équivalent
- Broyeur de graines de volume de broyage adapté et capable d'homogénéiser un mélange d'échantillon de graines et de milieu liquide. Il est indispensable de posséder plusieurs bols de broyage identiques et entièrement stérilisables.
- Hotte à flux laminaire ou poste de sécurité microbiologique pour préparation du mélange réactionnel et chargement des échantillons dans les tubes de PCR (si possible deux hottes ou postes séparés)
- Enceinte climatique thermostatée ou pièce à température contrôlée à 22±6°C

6. Contrôles et témoins

La technique de détection de régions cibles d'ADN d'un organisme par la technique de PCR en temps réel autorise l'utilisation d'une série de contrôles et témoins permettant de valider la bonne qualité de la manipulation. Ces contrôles et témoins ont différentes fonctions et leur utilisation permet de garantir que *i)* l'opérateur a correctement suivi le protocole, *ii)* les consommables et réactifs utilisés étaient de qualité suffisante, *iii)* les volumes prélevés par micropipettes, les températures et durées de réaction, la concentration et le pH des solutions utilisées étaient corrects, *iv)* l'extrait d'ADN était suffisant en quantité et amplifiable (pas d'interférence avec des composés inhibiteurs) et *v)* qu'il n'y a pas eu de contamination accidentelle des échantillons testés.
Les contrôles à produire au cours de l'analyse sont *a minima* les suivants :

- **Un contrôle de la qualité de l'extraction d'ADN et de la présence d'inhibiteur sera réalisé pour chaque prise d'essai.** Il prendra la forme d'un test PCR temps réel utilisant la combinaison d'amorces / sonde 18S uni -F/-R/-P. Ce test permet de générer un signal de fluorescence de nature exponentielle significativement supérieur au bruit de fond si de l'ADN de plante ou de champignon est présent dans un extrait, sans effet inhibiteur suffisant (Ioos et al. 2009). Toutefois, les prises d'essai qui sont positives pour le parasite cible ne nécessiteront pas systématiquement de contrôle de la qualité d'ADN. Ce test sera réalisé dans une autre réaction que le test de détection de *G. circinata*. L'analyse des courbes de fluorescence 18S uni-F/-R/-P se limitera aux données acquises lors des 30 premiers cycles exclusivement. Une S_{ADN} sera dite positive pour le test 18S uni si le Ct (Cycle threshold, cycle seuil) ou le Ct moyen généré est dans une gamme de Ct acceptable, préalablement déterminée expérimentalement par le laboratoire, sur ce type de matrice (Semences de *Pinus* sp.) dans ses propres conditions.

- **Un témoin négatif de processus (T-$_{PROC}$)** sera préparé pour toute série d'extractions. Ce dernier, constitué de PDB stérile, sera incubé en parallèle aux autres échantillons pour analyse et subira donc toutes les phases de l'analyse pour vérifier l'absence de contamination lors de la phase d'enrichissement et d'extraction d'ADN (1er type de faux positif). Le T-$_{PROC}$ sera lui aussi traité comme un échantillon pour analyse, c'est à dire broyé, suite à quoi une unique prise d'essai d'environ 500 µl sera réalisée pour extraction d'ADN.
- **Un témoin positif T+$_{18S\ Pinus}$** sera systématiquement testé en *triplicata* lors de chaque réaction de PCR en temps réel 18S uni. Il permet de vérifier que la réaction PCR 18S uni s'est effectuée de façon correcte. Ce T+$_{18S\ Pinus}$ est constitué d'une solution calibrée de plasmides bactériens dans lesquels est clonée une cible de test PCR 18S uni-F/-R/-P à partir d'ADN d'aiguilles de *Pinus*, ou d'une solution d'ADN d'aiguilles de *Pinus* à une concentration similaire à ce qui est obtenu en moyenne à partir d'échantillon à analyser.
- **Un témoin positif en limite pratique de détection (T$_{+LOD}$)** sera systématiquement testé en *triplicata* lors de chaque réaction de PCR en temps réel FCIR-F/-R/-P. Il permet de vérifier que la réaction PCR s'est effectuée de façon optimale (conditions thermodynamique, volumétrique, et chimique) pour que la plus petite quantité détectable de *G. circinata* puisse avoir été détectée dans un échantillon par ce protocole. Ce T$_{+LOD}$ est constitué d'une solution calibrée d'ADN génomique d'une souche référencée de *G. circinata* ou d'une solution calibrée de plasmides bactériens dans lesquels est clonée la cible du test PCR FCIR-F/-P/-R**.** Ce T$_{+LOD}$ doit être caractérisé par le laboratoire dans ses propres conditions. En pratique, le T$_{+LOD}$ peut être défini comme la plus petite quantité de cible produisant un résultat positif dans au moins 95 % des cas, assurant ainsi un taux de faux négatif ≤5%.
- **Un témoin positif en limite de détection (T+$_{LOD}$)** sera systématiquement testé en *triplicata* lors de chaque réaction de PCR conventionnelle CIRC1A/CIRC4A. Il permet de vérifier que la réaction PCR s'est effectuée de façon optimale (conditions thermodynamique et chimique) pour que la plus petite quantité détectable de *G. circinata* puisse avoir été détectée dans un échantillon. Ce T+$_{LOD}$ est constitué d'une solution calibrée d'ADN génomique d'une souche référencée de *G. circinata* ou d'une solution calibrée de plasmides bactériens dans lesquels est clonée la cible du test PCR CIRC1A/CIRC4A. Ce T+$_{LOD}$ doit être caractérisé par le laboratoire dans ses propres conditions. En pratique, le T+$_{LOD}$ peut être défini comme la plus petite quantité de cible produisant un résultat positif dans au moins 95 % des cas, assurant ainsi un taux de faux négatif ≤5%.
- **Un témoin négatif d'amplification** (**T-** ou **NTC,** no template control) sera systématiquement introduit en *triplicata* lors de chaque réaction de PCR en temps réel FCIR-F/-R/-P et de PCR conventionnelle CIRC1A/CIRC4A. Une prise d'échantillon "eau" subira donc toutes les phases de l'analyse à partir de la préparation du mélange réactionnel de PCR pour vérifier l'absence de contamination lors de cette phase et lors du chargement des **S$_{ADN}$** dans les tubes individuels de PCR (2eme type de faux positifs).

Ces contrôles ainsi que des contrôles supplémentaires que le laboratoire peut ajouter si nécessaire sont définis par la norme XP V03-043.

L'utilisation de ces contrôles et 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 et témoins 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 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. L'homogénéité des thermocycleurs comprenant un bloc à puits doit en outre être vérifiée, lorsque ce type de machine est utilisé.

Certains des témoins utilisés dans cette méthode sont constitués de 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 d'organismes génétiquement modifiés (bactéries viables) sont toutefois soumises à agrément par la Commission du Génie Génétique.

7. Prise d'essai

Le laboratoire doit mettre en place une procédure adaptée à son environnement (locaux, infrastructures, …) visant à éviter tout risque de confusion entre échantillons et de contamination d'un échantillon par un autre.

A partir de l'échantillon reçu au laboratoire, un prélèvement d'environ 1000 graines est effectué de façon aléatoire, à l'aide d'outils de prélèvement préalablement désinfectés par flambage ou à l'hypochlorite de sodium. Le tableau en annexe I fournit un poids de mille grains moyen pour les espèces de *Pinus* et *Pseudotsuga* les plus fréquentes. Une quantité de graines correspondant à ce poids de mille grains X g sera prélevée et pesée avec une erreur maximale tolérée de 0.5 g.
L'échantillon pour analyse est directement transféré dans un flacon plat de culture cellulaire stérilisé de volume adapté dans lequel on procédera à un enrichissement biologique. Pour chaque échantillon pour analyse qui sera broyé, deux prises d'essai d'environ 500 µl de broyat liquide seront prélevées et transférées dans des microtubes stériles de 2 ml pour analyse.

8. Etapes de l'analyse

8.1. Enrichissement biologique et broyage des prises d'essai

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

1. Etaler les graines sans prétraitement ni stérilisation externe dans le flacon plat de culture ou dans le sac plastique de manière à n'obtenir qu'une couche d'une graine d'épaisseur
2. Y rajouter la quantité de PDB suffisante pour que les graines soient pratiquement complètement immergées. Incuber les graines pendant 72 à 80 heures dans le milieu liquide PDB, à 22°C±6°C.
3. Après enrichissement, broyer l'ensemble des graines et le milieu d'enrichissement dans un bol de broyage du mixer, jusqu'à obtenir un broyat liquide suffisamment homogène. A cette étape, il est possible de rajouter une quantité appropriée de PDB ou d'eau stérile au cours du broyage si le broyat est trop épais.
4. Prélever de façon aléatoire dans le broyat deux prises d'essai (a et b) d'environ 500 µl, en utilisant un cône de micropipette adapté (à tronquer si besoin) et transférer chaque prise d'essai dans un microtube stérile de 2 ml. A cette étape, environ 1000 µl de broyat doivent être prélevés en supplément, identifiés et conservés congelés en cas de nécessité de confirmation d'un positif par un laboratoire de référence.

8.2. Extraction d'ADN total

1. Ajouter le volume de tampon de lyse préconisé par le fournisseur dans chaque tube de prise d'essai (en général autour de 400 µl)
2. Pour chaque prise d'essai, tremper l'extrémité d'un cône stérile de 1000 µl sur 1 cm de profondeur dans de la poudre de PVPP et agiter ce cône nappé de PVPP dans la prise d'essai, retirer le cône, le jeter.
3. Incuber chaque tube environ 20 min à environ 65°C (ou à la température recommandée par le fabricant de kit d'extraction d'ADN). Pendant l'incubation, vortexer chaque tube à au moins une reprise pour ré-homogénéiser leur contenu qui aura tendance à précipiter.
4. A la fin de l'incubation centrifuger les tubes environ 2 min à environ 11 000 g. Prélever le surnageant pour poursuivre l'extraction.
5. Le surnageant prélevé est transféré dans un nouveau microtube stérile ou dans la première colonne de filtration du kit d'extraction d'ADN. Le microtube contenant le culot cellulaire est détruit. L'extraction d'ADN se poursuit ensuite en suivant les recommandations du fournisseur du kit d'extraction d'ADN.
6. A la fin du mode opératoire prescrit par le fabricant, l'ADN total extrait est élué dans un volume final de 100 µl de tampon d'élution. Cette solution d'ADN total constituera la solution (extrait) d'ADN directement analysée par PCR en temps réel (S_{ADN}).

8.3. Test de détection par PCR en temps réel

Préparation et distribution du mélange réactionnel de détection FCIR-F/-R/-P
La composition du mélange réactionnel (volume réactionnel de 20 µl) est la suivante :

Composé	Concentration finale
Eau Ultra Pure	qsp 20 µl
Tampon de polymérase à ADN fourni avec la polymérase à ADN	1 X
Chlorure de Magnésium	5 mM
Amorce sens « FCIR-F »	0.3 µM
Amorce antisens « FCIR-R »	0.3 µM
Sonde « FCIR-P »	0.1 µM
dNTPs mix	4 x 200 µM
Polymérase à ADN de type Hotstart	0.025 U/µl

1. Le mix se prépare dans un microtube stérile de 1.5 ou 2 ml,
2. Les différents composants, excepté la Polymérase à ADN, sont décongelés à température ambiante puis homogénéisés par vortexage.
3. Les différents composants sont ajoutés au microtube stérile à l'aide de micropipettes obligatoirement munies de microcônes stériles à embout filtre.
4. Si elle n'est pas mélangée à un prémix commercial, la polymérase à ADN est ajoutée en dernier dans le mix, en mélangeant cette dernière plusieurs fois par aspiration/refoulement dans le mélange réactionnel.
5. Le microtube contenant le mix complet doit être passé au vortex pendant au moins 5 secondes avant sa distribution.
6. Le mix est distribué dans les microtubes de PCR identifiables à raison de 18 µl par microtube.

Addition des solutions d'ADN à tester dans les microtubes de PCR
L'addition des S_{ADN} à tester ainsi que des solutions d'ADN servant de contrôles s'effectuera de préférence dans une zone physiquement séparée de la zone où se sont effectuées la préparation et la distribution du mélange réactionnel. Il est souhaitable d'utiliser un jeu de micropipettes uniquement réservé à cet effet.

1. Les différentes solutions S_{ADN} correspondant aux différentes prises d'essai sont testées en *triplicata* (3 tubes ou capillaires PCR individuels) à raison de 2 µl par microtube de PCR à l'aide d'une micropipette munie d'un microcône stérile à embout filtre.
2. Les S_{ADN} des différents contrôles sont ajoutés et testées en *triplicata* : $T-_{PROC}$, $T+_{LOD}$, etc.. Pour le T-, on substitue à la S_{ADN} 2 µl d'eau ultra pure stérile. Il est recommandé d'ajouter les témoins positifs en fin de manipulation, après avoir refermé de façon étanche les tubes correspondants aux échantillons à tester.
3. Les microtubes sont transférés dans le bloc ou le rotor du thermocycleur.

Paramètres de l'amplification par PCR en temps réel FCIR3-F/-R/-P
Les différents paramètres de la PCR en temps réel pour la détection de *G. circinata* sont les suivants (Ioos et al. 2009) :

Etape		Température de consigne	Durée programmée	Nombre de cycles
1	Dénaturation initiale / activation de la polymérase Hotstart	95 °C	Suivre les préconisations du fournisseur	1
2	Dénaturation	95°C	15 sec	**40**
3	Hybridation - polymérisation	**70°C**	**55 sec puis mesure de la fluorescence**	

A la fin de l'amplification par polymérisation en chaîne, les tubes de PCR sont évacués et détruits.

Test de contrôle qualité d'ADN par PCR en temps réel 18S uni-F/-R/-P
Ce test sera réalisé en parallèle du test de détection de *G. circinata*. La composition du mélange réactionnel est identique à celui indiqué pour la recherche de *G. circinata*, en substituant simplement les amorces et la sonde FCIR-F/-R/-P par les amorces et la sonde 18S uni -F/-R/-P. Les conditions d'amplification sont identiques à celles employées pour la recherche de *G. circinata*, mis à part la température d'hybridation/synthèse qui est fixée à 65°C et le nombre de cycles nécessaire fixé à 30. Chaque prise d'essai sera testée au minimum une fois par ce test.

Validation de l'analyse FCIR-F/-R/-P
La validation de l'analyse s'effectue en observant les courbes de fluorescence mesurées par l'appareil de PCR en temps réel et générées à partir des différents témoins.
L'opérateur détermine une ligne de seuil (« threshold line ») qui constituera la limite minimale de fluorescence « FAM » à atteindre pour qu'un signal de fluorescence émis soit significativement supérieur au signal du bruit de fond (représenté par la « base line »). La ligne de seuil se place en général à un niveau de fluorescence au moins 10 fois supérieur à celui généré par le bruit de fond et où les réplicats du $T+_{LOD}$ sont les plus proches les uns des autres. Le cycle théorique estimé à partir duquel le niveau de fluorescence généré par un échantillon franchit cette ligne seuil avec une nature exponentielle correspond au Ct.

L'analyse est considérée validée si et seulement si l'ensemble des conditions suivantes est réuni en fin de réaction :
a) Aucun des réplicats de $T-_{PROC}$ n'a généré de fluorescence « FAM » supérieure à la ligne de seuil déterminée => il n'y a pas eu de contamination croisée accidentelle pendant la phase de broyage et d'extraction d'ADN de la série des échantillons analysés.
b) Aucun des réplicats de T- (NTC) n'a généré de fluorescence « FAM » supérieure à la ligne de seuil déterminée => il n'y a pas eu de contamination accidentelle pendant la préparation du mélange réactionnel et l'ajout des S_{ADN}.
c) Les réplicats de $T+_{LOD}$ ont chacun généré un niveau de fluorescence « FAM » supérieur à la ligne de seuil déterminée => les conditions de PCR et la composition du mélange réactionnel de PCR ont permis d'amplifier spécifiquement et avec une performance optimale la séquence cible chez *G. circinata*.

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

Interprétation et formulation des résultats
Si la série d'analyse est validée, les résultats peuvent être considérés comme interprétables pour l'ensemble des S_{ADN}, donc des prises d'essai et de leur réplicats, testés au cours de la même réaction de PCR.
Pour chacune des réactions de PCR, observer le Ct du contrôle $T+_{LOD}$= Ct_{LOD}. Tous les extraits d'ADN testés lors de la réaction validée dont le Ct est inférieur à Ct_{LOD}+3 seront considérés comme positifs.

a) Si les trois réplicats d'une des prises d'essai sont positifs pour le test FCIR-F/-R/-P, la prise d'essai considérée devra être testée pour confirmation par PCR conventionnelle CIRC1A/CIRC4A
b) Si un ou deux réplicats parmi les trois d'une des prises d'essai sont positifs pour le test FCIR-F/-R/-P, refaire un test PCR FCIR-F/-R/-P en *triplicata*.
c) Si aucun des réplicats de S_{ADN} des deux prises d'essai (S_{ADN}a et S_{ADN}b) n'est positif pour le test FCIR-F/-R/-P et que les deux S_{ADN} sont positives pour le test 18S uni, l'échantillon pour analyse est dit négatif pour *G. circinata*. Le résultat sera alors exprimé par une phrase du type « Résultat négatif pour la détection de *G. circinata* dans l'échantillon analysé» en citant la méthode ci-décrite et en précisant le seuil de détection de la méthode[1].
d) Si aucun des réplicats des deux S_{ADN} de l'une des prises d'essais n'est positif pour le test FCIR-F/-R/-P et que la S_{ADN} correspondante est aussi négative pour le test 18S uni, la ou les prises d'essai sont dites « non utilisable(s) » pour la recherche de *G. circinata*. Ce cas de figure traduit i) une mauvaise extraction de l'ADN total de la prise d'essai considérée, ou ii) une présence trop importante de composés à effet inhibiteur dans S_{ADN}. Dans le premier cas i), il faudra vérifier qu'une quantité suffisante d'ADN a été extraite pour chacune des prises d'essai par

[1] Le seuil de détection est soit celui de la méthode globale s'il a pu être déterminé, soit celui de la réaction d'amplification par PCR ($T+_{LOD}$). Dans les deux cas le seuil doit être déterminé expérimentalement par le laboratoire, dans ses propres conditions

dosage au spectrophotomètre ou par électrophorèse sur gel. Si ce n'est pas le cas, l'extraction d'ADN n'a pas été correctement réalisée et une nouvelle prise d'essai sera réalisée si la taille de l'échantillon le permet. Dans le deuxième cas ii), une dilution de la S_{ADN} doit être analysée pour tenter de diminuer l'effet inhibiteur. Si l'effet inhibiteur ne peut être levé, le résultat sera alors exprimé par « résultat indéterminé » selon la méthode ci décrite, et mentionner la cause de l'indétermination.

Le diagramme décisionnel présenté en annexe II résume ces conditions.

8.4. Test de confirmation par PCR conventionnelle

Préparation et distribution du mélange réactionnel de PCR conventionnelle CIRC1A/CIRC4A
La composition du mélange réactionnel (volume réactionnel de 25 µl) est la suivante :

Composé	*Concentration finale*
Eau Ultra Pure	qsp 25 µl
Tampon de polymérase à ADN fourni avec la polymérase à ADN	1 X
Chlorure de Magnésium	2 mM
Amorce sens « CIRC1A »	0.5 µM
Amorce antisens « CIRC4A »	0.5 µM
dNTPs mix	4 x 250 µM
Polymérase à ADN de type « Hotstart »	0.05 U/µl

1. Le mix se prépare dans un microtube stérile de 1.5 ou 2 ml.
2. Les différents composants, excepté la Polymérase à ADN, sont décongelés sur la paillasse à température ambiante puis homogénéisés par vortexage.
3. Les différents composants sont ajoutés au microtube stérile à l'aide de micropipettes obligatoirement munies de microcônes stériles à embout filtre.
4. La polymérase à ADN est ajoutée en dernier dans le mix
5. Le microtube contenant le mix complet doit être passé au vortex pendant 10 secondes avant sa distribution.
6. Le mix est distribué à raison de 18.75 µl par tube dans les microtubes de PCR placés dans de la glace pilée.

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

1. Les différentes solutions S_{ADN} correspondant aux différentes prises d'essai à confirmer sont testées en *triplicata* (3 tubes ou capillaires PCR individuels) à l'aide d'une micropipette munie d'un microcône stérile à embout filtre, à raison de 6.25 µl de solution par microtube de PCR.
2. Les S_{ADN} des différents contrôles sont ajoutés et testés par au moins une PCR : $T+_{LOD}$ et T-.
3. Les microtubes sont ensuite refermés de façon étanche et transférés dans le bloc ou le rotor du thermocycleur

Amplification par PCR CIRC1A/CIRC4A
Les différents paramètres de la PCR conventionnelle pour la détection de *G. circinata* sont les suivants (Schweigkofler et al. 2004) :

Etape		**Température de consigne**	**Durée programmée**	**Nombre de cycles**
1	Dénaturation initiale	95 °C	Suivre les préconisations du fournisseur	1
2	Dénaturation	95°C	35 sec	**45**
	Hybridation	**66°C**	55 sec	
	Polymérisation d'ADN	72 °C	50 sec	
3	Elongation finale	72°C	12 min	1

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

Il est obligatoire de manipuler les produits post PCR (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).
Les produits de PCR de confirmation CIRC1A/CIRC4A seront séparés par électrophorèse sur un gel d'agarose à environ 1%, en parallèle avec un marqueur de taille moléculaire.
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.
Après l'électrophorèse, le gel est incubé dans une cuve contenant une solution de bromure d'éthidium de concentration appropriée puis placé sur un transilluminateur à UV en veillant à ne pas exposer le manipulateur au rayonnement.
Il est obligatoire d'effectuer une prise de vue du gel exposé aux UV et de la sauvegarder sous forme d'impression ou fichier informatique pour l'analyse et l'archivage des résultats. La prise de vue devra s'effectuer rapidement, car l'ADN est dégradé lors d'une exposition prolongée aux UV.

Validation de l'analyse CIRC1A/CIRC4A
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 est réuni :

- Le T- ne présente aucun fragment amplifié de 360 pb visible => il n'y a pas eu de contamination accidentelle pendant la préparation du mix et l'ajout des S_{ADN}.
- Le $T+_{LOD}$ présente un fragment amplifié visible et de taille attendue (environ 360 paires de bases) => L'amplification du $T+_{LOD}$ 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, etc.) pour permettre la détection de la plus petite quantité détectable de *G. circinata.*

Dans le cas où au moins une condition ne serait pas respectée, l'analyse n'est pas validée et selon le type d'anomalie observée, tout ou partie de l'analyse est à refaire.

Résultats pour les échantillons
Si l'analyse est validée, les résultats peuvent être considérés comme interprétables pour l'ensemble des S_{ADN}, donc des prises d'essai, testées au cours du même test PCR.

a) Si pour une S_{ADN} cible testée par PCR CIRC1A/CIRC4A, les trois réplicats génèrent un fragment amplifié de taille attendue (environ 360 pb), la prise d'essai est dite positive pour *G. circinata.* Le résultat sera exprimé par une phrase du type **« Présence de *G. circinata*»** dans l'échantillon analysé en citant la méthode ci-écrite.
b) Si pour une S_{ADN} cible testée par PCR CIRC1A/CIRC4A, seuls un ou deux réplicats génèrent un fragment amplifié de taille attendue (environ 360 pb), le test PCR est à refaire à nouveau en *triplicata*. Si à nouveau seuls un ou deux réplicats génèrent un fragment amplifié de taille attendue (environ 360 pb), le résultat sera considéré comme douteux, et des analyses complémentaires pourront être mises en œuvre (e.g. analyse de la séquence de l'amplicon).
c) Si pour une S_{ADN} cible testée par PCR CIRC1A/CIRC4A aucun des réplicats ne génère de fragment amplifié ou qu'il n'a pas la taille attendue, la prise d'essai est dite négative pour *G. circinata.* Si l'ensemble des prises d'essai est négartif pour un échantillon donné, le résultat sera exprimé par une phrase du type « **Résultat négatif pour la détection de *G. circinata*** » dans l'échantillon analysé en citant la méthode ci-décrite et en précisant le seuil de détection de la méthode.

Le diagramme décisionnel présenté en annexe II résume ces conditions.

9. Résultats

9.1. Validation de l'analyse

Les tests de PCR en temps réel FCIR-F/-R/-P et de PCR conventionnelle CIRC1A/CIRC4A doivent être validés indépendamment selon les critères énoncés aux §83 et §84.

9.2. Interprétation et formulation des résultats

La formulation des résultats doit se faire conformément au §83 ou au §84 pour les résultats négatifs et au §84 pour les résultats positifs.

Le diagramme décisionnel présenté en annexe II résume l'ensemble de ces conditions.

10. Élimination des matériels susceptibles d'être contaminants

Le laboratoire doit mettre en œuvre des mesures prenant en compte ces risques pour garantir la non dissémination de l'organisme nuisible dans l'environnement.
Les tubes et autres consommables plastiques ayant été utilisés pendant la phase d'extraction – purification d'ADN total peuvent être éliminés sans traitement particulier (plus de parasite viable à ce stade).
Les tubes et autres consommables plastiques ayant été utilisés lors de la phase de préparation du mix et chargement des S_{ADN} peuvent être éliminés sans traitement particulier.

11. Conservation des reliquats de matériels utilisés

Sauf mention contraire explicite ou impossibilité technique avérée, les laboratoires doivent conserver les reliquats pertinents (nature, quantité et qualité) de matériel soumis à analyse, dans des conditions appropriées garantissant leur intégrité, jusqu'à au moins le dixième jour ouvrable suivant l'envoi au demandeur d'un rapport d'analyse concluant à la non mise en évidence de l'organisme recherché. Ce délai imposé est destiné à laisser le temps au demandeur de l'analyse de contester le résultat auprès du laboratoire (ce qui prolonge la conservation du reliquat jusqu'à l'issue de la contestation) et éventuellement de demander une analyse contradictoire.
Dans le cas d'un résultat autre que la non mise en évidence de l'organisme recherché, et sauf indications plus précises dans la méthode, l'ensemble des reliquats pertinents doit être conservé pendant une durée minimale de 12 mois, sauf pour les parties éventuellement transmises à un autre laboratoire agréé ou de référence, à qui est alors transférée la charge de conservation des reliquats. Le laboratoire national de référence peut demander que tout ou partie de ces reliquats lui soient transmis, aux frais des laboratoires agréés ou reconnus, dans le cadre des missions qui lui sont confiées.

LISTE DES DOCUMENTS OFFICIELS APPELES PAR LA METHODE

Référence	Titre
Décret 2006-7 du 4 janvier 2006	Décret 2006-7 du 4 janvier 2006 relatif aux laboratoires nationaux de référence, ainsi qu'à l'agrément et à la reconnaissance des laboratoires d'analyses dans le domaine de la santé publique vétérinaire et de la protection des végétaux, et modifiant le code rural
Arrêté ministériel du 19 décembre 2007	Arrêté ministériel du 19 décembre 2007 fixant les conditions générales d'agrément des laboratoires d'analyses dans le domaine de la santé publique vétérinaire et de la protection des végétaux
Norme XP V03 - 043	Exigences générales pour la réalisation d'analyses utilisant la biologie moléculaire pour la détection et l'identification d'organismes pathogènes, d'altération et ravageurs des végétaux et produits dérivés
Dossier d'évaluation Gcircinata_2010	Développement, évaluation et validation de 3 méthodes de détection du champignon *Gibberella circinata* sur tissus végétatifs et semences de *Pinus* spp. et *Pseudotsuga menziesii*
REP 001	Répertoire des recettes en vigueur au LNPV
GLO 001	Glossaire des termes techniques en vigueur au LNPV

BIBLIOGRAPHIE SUCCINCTE

Ioos R, Fourrier C, Iancu G, Gordon TR, 2009. Sensitive Detection of *Fusarium circinatum* in Pine Seed by Combining an Enrichment Procedure with a Real-Time Polymerase Chain Reaction Using Dual-Labeled Probe Chemistry. *Phytopathology* 99, 582-590.

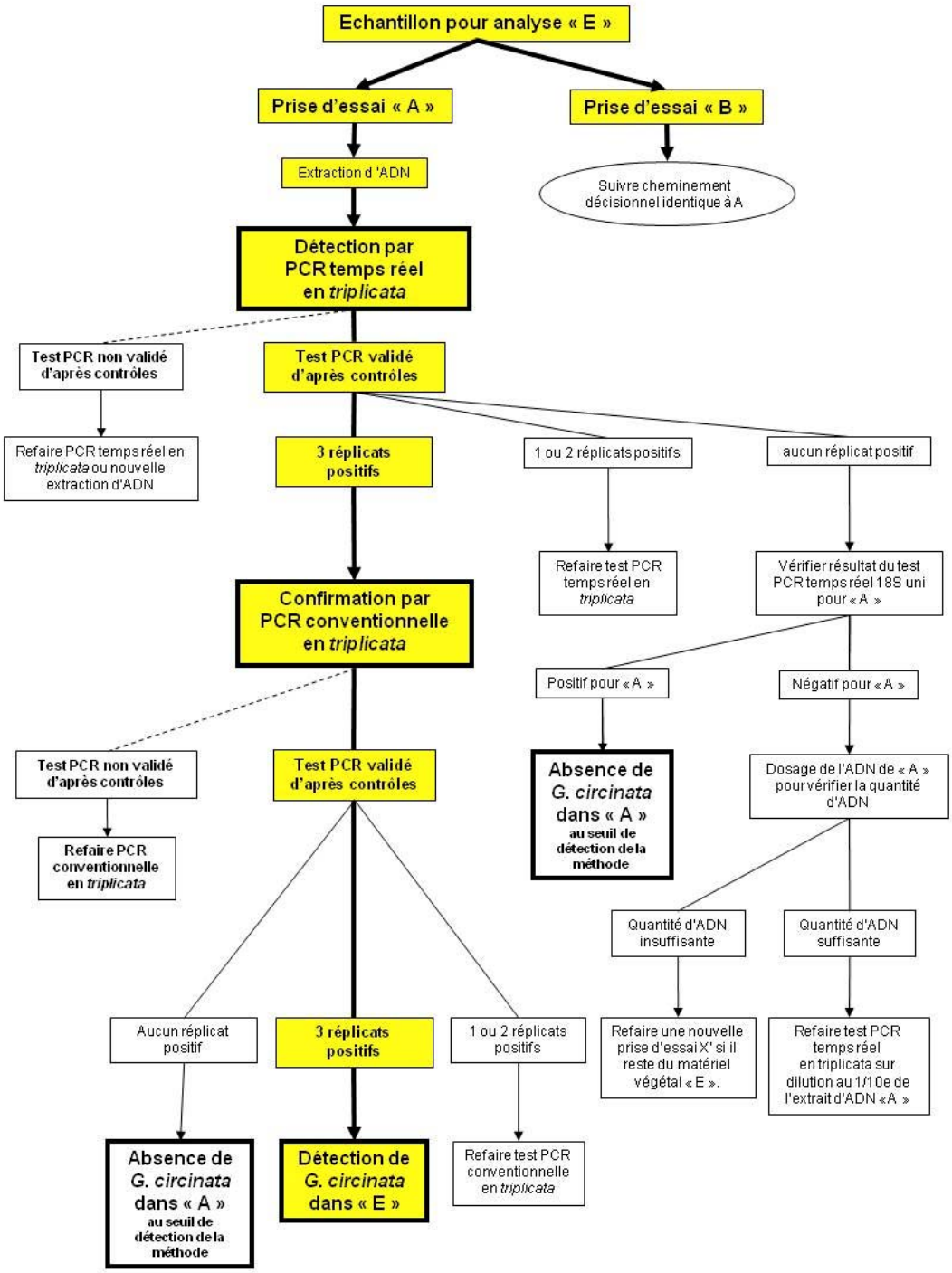
Schweigkofler W, O'Donnell K, Garbelotto M, 2004. Detection and quantification of airborne conidia of *Fusarium circinatum*, the causal agent of pine pitch canker, from two California sites by using a real-time PCR approach combined with a simple spore trapping method. *Applied And Environmental Microbiology* 70, 3512-3520.

ANNEXE I

Poids de mille grains moyen pour les principales espèces de *Pinus* et *Pseudotsuga menziesii.*

Espèce	Poids de mille grains moyen (g)	Espèce	Poids de mille grains moyen (g)
Pinus aristata	22	*Pinus mugo* subsp. *pumilio*	6
Pinus armandi	245	*Pinus nigra* subsp. *koekelare*	21
Pinus banksiana	4	*Pinus nigra* var. *austriaca*	20
Pinus bungeana	130	*Pinus nigra* var. *calabrica*	18
Pinus brutia	53	*Pinus nigra* var. *corsicana*	15
Pinus canariensis	120	*Pinus nigra* subsp. *salzmannii*	16
Pinus cembra	350	*Pinus palustris*	75
Pinus contorta var. *latifolia*	5	*Pinus parviflora*	125
Pinus coulteri	330	*Pinus pinaster*	55
Pinus eldarica	62	*Pinus pinea*	895
Pinus densiflora	18	*Pinus ponderosa*	42
Pinus gerardiana	295	*Pinus pumila*	105
Pinus griffithi	58	*Pinus radiata*	29
Pinus halepensis	18	*Pinus rigida*	7
Pinus jeffreyi	110	*Pinus strobus*	14
Pinus koraiensis	460	*Pinus sylvestris*	7
Pinus lambertiana	300	*Pinus tabuliformis*	32
Pinus leucodermis	25	*Pinus taeda*	27
Pinus montana uncinata	9	*Pinus thunbergii*	14
Pinus uncinata	19	*Pinus wallichiana*	50
Pinus mugo subsp. *mugo*	7	*Pseudotsuga menziesii*	13

ANNEXE II


Echantillon pour analyse « E »
Prise d'essai « A »
Prise d'essai « B »
Extraction d 'ADN
Suivre cheminement décisionnel identique à A
Détection par PCR temps réel en triplicata
Test PCR non validé d'après contrôles
Test PCR validé d'après contrôles
Refaire PCR temps réel en triplicata ou nouvelle extraction d'ADN
3 réplicats positifs
1 ou 2 réplicats positifs
aucun réplicat positif
Refaire test PCR temps réel en triplicata
Vérifier résultat du test PCR temps réel 18S uni pour « A »
Confirmation par PCR conventionnelle en triplicata
Positif pour « A »
Négatif pour « A »
Test PCR non validé d'après contrôles
Test PCR validé d'après contrôles
Absence de G. circinata dans « A » au seuil de détection de la méthode
Dosage de l'ADN de « A » pour vérifier la quantité d'ADN
Refaire PCR conventionnelle en triplicata
Quantité d'ADN insuffisante
Quantité d'ADN suffisante
Aucun réplicat positif
3 réplicats positifs
1 ou 2 réplicats positifs
Refaire une nouvelle prise d'essai X' si il reste du matériel végétal « E ».
Refaire test PCR temps réel en triplicata sur dilution au 1/10e de l'extrait d'ADN « A »
Absence de G. circinata dans « A » au seuil de détection de la méthode
Détection de G. circinata dans « E »
Refaire test PCR conventionnelle en triplicata

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

Laboratoire national de la protection des végétaux,
7 rue Jean Dixméras, 49044 ANGERS cedex 01
lnpv.sdqpv.dgal@agriculture.gouv.fr

Ce document est édité par :

Ministère de l'alimentation, de l'agriculture et de la pêche
Direction générale de l'alimentation
Service de la prévention des risques sanitaires de la production primaire
Sous-direction de la qualité et de la protection des végétaux
251 rue de Vaugirard, 75732 PARIS Cedex 15
www.agriculture.gouv.fr

auprès de qui toute autre correspondance peut être adressée.

Liberté • Égalité • Fraternité
RÉPUBLIQUE FRANÇAISE

MINISTÈRE
DE L'ALIMENTATION
DE L'AGRICULTURE
ET DE LA PÊCHE

METHODE OFFICIELLE D'ANALYSE

Détection de *Gibberella circinata*

Réf. : MOA 003 Partie C version 1a

Droits de reproduction et Copyright

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

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

Dates de validité du présent document

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

Cependant, et sauf indication contraire explicite, la version précédente peut encore être utilisée pendant une durée maximale de 15 mois à compter de la date de publication de la nouvelle version, afin de tenir compte des cycles d'accréditation auxquels sont soumis les laboratoires de référence, agréés et reconnus officiellement.

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

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

MOA 003 partie C	Consultation publique		Validité	
Numéro de la version	Début	Fin	Début	Fin
Version 1 a	Mars 2010	Juin 2011	Mars 2010	

SOMMAIRE

PREAMBULE **5**

Objet des méthodes officielles 5
Glossaire, abréviations et documents connexes 5
Limites imposées aux laboratoires agréés ou reconnus 5
Échantillonnage et échantillon 5
Modification des méthodes officielles 5
Considérations d'ordre métrologique 6
Obligations réglementaires et limites de responsabilité 6
Revue des méthodes officielles, amendement et modification 7

ORIGINE DE LA METHODE ET REMERCIEMENTS **8**

PRINCIPALES MODIFICATIONS PAR RAPPORT A LA VERSION PRECEDENTE **9**

Modifications majeurs 9
Améliorations 9

DESCRIPTION DE LA METHODE **10**

1. Objet. 10
2. Domaine d'application. 10
3. Présentation schématique de la détection 12
4. Produits et consommables 12
5. Appareillage et matériel 13
6. Prise d'essai 13
7. Etapes de l'analyse 14
   - 7.1. Isolement sur milieu semi-sélectif 14
   - 7.2. Lecture des boîtes d'isolement et repiquage des *Fusarium* spp. 14
   - 7.3. Identification de *Fusarium circinatum*, anamorphe de *G. circinata* 14
8. Expression et formulation des résultats 18
9. Élimination des matériels susceptibles d'être contaminants 18
10. Conservation des reliquats de matériels utilisés 18

LISTE DES DOCUMENTS OFFICIELS APPELES PAR LA METHODE **19**

BIBLIOGRAPHIE SUCCINCTE **20**

ANNEXE I **21**

ANNEXE II **23**

PREAMBULE

OBJET DES METHODES OFFICIELLES

Les méthodes officielles, au sens du décret 2006-7 du 4 Janvier 2006, sont les méthodes validées par le ministère chargé de l'agriculture pour l'utilisation dans le cadre des actes officiels relevant de ses services (plans de contrôle et de surveillance, contrôles à l'importation et à l'exportation…). Ces méthodes concernent le diagnostic, la détection ou l'identification d'organismes nuisibles aux cultures, d'organismes envahissants ou d'organismes génétiquement modifiés pour le domaine d'application précisé dans la méthode.
Ces méthodes servent de « méthodes publiées » au sens de la norme ISO 17025 pour l'accréditation des laboratoires par le COFRAC.

GLOSSAIRE, ABREVIATIONS ET DOCUMENTS CONNEXES

Afin de limiter les problèmes d'interprétation des termes employés, le vocabulaire utilisé dans les méthodes officielles du ministère chargé de l'agriculture est issu des normes, guides ou glossaires nationaux ou internationaux appropriés (AFNOR, ISO, CIPV, OEPP…).
Le glossaire GLO-001 reprend les principales définitions. L'attention des lecteurs est attirée sur le fait que les termes intégrés au glossaire ne sont, en règle générale, pas spécifiquement repérés dans le corps des méthodes officielles.
Certains documents (composition de milieux et tampons…) peuvent être communs à plusieurs méthodes officielles. Pour faciliter leur harmonisation et leur mise à jour, ils sont rassemblés dans des recueils spécifiques, considérés comme faisant partie intégrante des méthodes officielles. Les méthodes officielles appellent alors ces documents spécifiques en donnant leur code tel que repris dans les recueils.

LIMITES IMPOSEES AUX LABORATOIRES AGREES OU RECONNUS

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

ECHANTILLONNAGE ET ECHANTILLON

L'échantillonnage, est de la responsabilité des préleveurs et ses modalités sont définies par ailleurs.
L' échantillon reçu est réputé être homogène en l'état de sa réception, par contre, il n'est pas forcément représentatif du lot d'où il provient et le laboratoire ne pourra en aucune façon attester du caractère représentatif au sens de la statistique.
Le laboratoire peut être amené à séparer l'échantillon reçu en sous-échantillons pour les besoins de l'analyse, il s'agit alors d'une simple division et non d'un réel sous-échantillonnage au sens de la statistique, et le laboratoire n'a pas de ce fait à être accrédité pour l'échantillonnage.

MODIFICATION DES METHODES OFFICIELLES

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

Une méthode dérivée résulte de modifications de portées limitées appliquées à la méthode officielle (par exemple, remplacement d'une procédure d'extraction de l'ADN par une autre, utilisation d'un appareil de préparation de l'échantillon différent de celui prévu dans la méthode officielle…).
Une méthode alternative s'appuie sur des principes ou des technologies différentes de celles décrites dans les méthodes officielles, il s'agit réellement d'une autre méthode.
Un réactif-clé est un réactif directement impliqué dans la reconnaissance des organismes recherchés.
Les laboratoires agréés évaluent les conséquences de la modification (d'une méthode par une autre ou d'un réactif-clé par un autre) conformément aux prescriptions du LNR et transmettent le dossier d'évaluation correspondant au LNR pour validation de cette modification.

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

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

CONSIDERATIONS D'ORDRE METROLOGIQUE

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

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

OBLIGATIONS REGLEMENTAIRES ET LIMITES DE RESPONSABILITE

La mise en œuvre des méthodes officielles s'applique sans préjudice des réglementations françaises et communautaires ou des exigences normatives auxquelles doivent se soumettre les laboratoires (circulation, détention, manipulation des organismes nuisibles, détention des substances réglementées, bonnes pratiques de laboratoire, santé et sécurité au travail, mesures de confinement, agrément des laboratoires, déclaration à la commission de génie génétique …).
Dans un certain nombre de cas, les méthodes peuvent appeler l'attention des lecteurs sur des risques potentiels liés par exemple à la dangerosité de certains produits ou à la rupture du confinement. Ces mises en garde ne sont destinées qu'à aider les lecteurs et n'ont vocation ni à être exhaustives, ni à se substituer aux exigences réglementaires existantes.
Toute personne physique ou morale constatant la présence, sur un végétal, une partie de végétal ou un produit d'origine végétale, d'un organisme nuisible réglementé a l'obligation d'en faire déclaration auprès des services régionaux de l'alimentation des directions régionales de l'alimentation, de l'agriculture et de la forêt.

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

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

REVUE DES METHODES OFFICIELLES, AMENDEMENT ET MODIFICATION

Les méthodes officielles sont revues périodiquement à l'initiative du ministère chargé de l'agriculture ou du laboratoire national de référence. A chaque modification, le code de la méthode change comme indiqué au chapitre « principales modifications par rapport à la version précédente ».
Les usagers sont également invités à faire connaître dans les meilleurs délais leurs remarques, commentaires et suggestions, et à signaler toute erreur, omission ou imprécision constatées.

ORIGINE DE LA METHODE ET REMERCIEMENTS

La présente version de la méthode a été rédigée en adaptant une méthode d'isolement des *Fusarium* spp. Utilisée sur les céréales (méthode officielle MH.03.16) à la recherche spécifique de la forme imparfaite de *Gibberella circinata* (*Fusarium circinatum*). L'identification morphologique de cette espèce est basée sur la littérature scientifique et sur le retour d'expérience du panel mycologie de l'OEPP.

La présente méthode a été mise au point, optimisée et évaluée par la station de mycologie du LNPV.
Le travail de relecture et de revue documentaire a été effectué par le pôle développement de méthodes du LNPV, le bureau des semences et de la santé des végétaux et le département santé des forêts du Ministère chargé de l'alimentation, de l'agriculture et de la pêche.

PRINCIPALES MODIFICATIONS PAR RAPPORT A LA VERSION PRECEDENTE

MODIFICATIONS

Sans objet (première version publiée).

AMELIORATIONS

Sans objet (première version publiée).

DESCRIPTION DE LA METHODE

Détection de *Gibberella circinata* Nirenberg & O'Donnell (anamorphe *Fusarium circinatum* Nirenberg & O'Donnell) dans une matrice de tissus végétatif par les techniques d'isolement mycologique et caractérisation morphométrique

1. Objet.

Gibberella circinata Nirenberg & O'Donnell (anamorphe *Fusarium circinatum* Niremberg & O'Donnell ; Syn *F. subglutinans* [Wollenweb and Reinking] Nelson, Toussoun and Marasas f. sp. *pini*) est un important agent pathogène des *Pinus* spp. et de *Pseudotsuga menziesii* qui cause des chancres résineux sur arbres adultes et pourritures racinaires ou mortalité chez les jeunes semis. Les graines et les jeunes plants infectés de *Pinus* spp. et de *Pseudotsuga menziesii* peuvent véhiculer le parasite de régions infectées vers des régions saines.

G. circinata cause des lésions qui peuvent encercler voire étrangler des branches, des racines apparentes, voire des troncs de *Pinus* spp. Chez *P. menziesii*, les symptômes décrits se limitent à des dépérissements d'extrémité de rameaux. L'extrémité des branches étranglées par la nécrose peut flétrir ou dépérir à cause d'une mauvaise circulation des flux de sèves. Les aiguilles sur ces extrémités de branches peuvent jaunir ou rougir, puis finalement tomber. Des faisceaux entiers d'aiguilles peuvent aussi finir par chuter, laissant les branches nues. Des points d'infection multiples à différents endroits de la couronne peuvent finir par causer un dépérissement généralisé à ce niveau, pour aboutir à la mort de l'arbre dans les cas les plus sévères. Des chancres à méplat ou d'aspect humide peuvent apparaître sur le tronc lorsque l'arbre présente de nombreux sites d'infections sur les branches.
Au niveau des branches, voire du tronc, l'arbre produit d'abondants suintements de résine en réponse à l'infection par ce parasite.
Le champignon n'est pas décrit comme parasite vasculaire, chaque chancre ou lésion est donc la conséquence d'une infection distincte. Les insectes foreurs sont les principaux vecteurs du parasite, et vont initier les sites d'infections sur un arbre.
Sur des plantules infectées, l'infection se manifeste généralement par un symptôme de type fonte de semis. Il est toutefois possible que le champignon affecte une plantule sans symptôme apparent pendant plusieurs mois avant d'exprimer la maladie (infection latente).

L'objet de cette méthode est de détecter la présence de *G. circinata* dans un échantillon de tissu végétatif par le biais de l'isolement et de la caractérisation morphologique de son anamorphe en culture pure.
Les échantillons pour lesquels une réponse négative est obtenue sont considérés comme indemnes de *G. circinata* ou contaminés à un niveau trop faible ou contaminé par une forme non cultivable (quiescente, morte) pour être mis en évidence par la technique utilisée.

2. Domaine d'application.

Objets susceptibles d'être soumis à analyse.
Cette méthode concerne uniquement les semis, plants et sujets adultes de *Pinus* spp. et *Pseudotsuga menziesii*. 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

Limitations relatives aux objets susceptibles d'être soumis à analyse.
Aucune

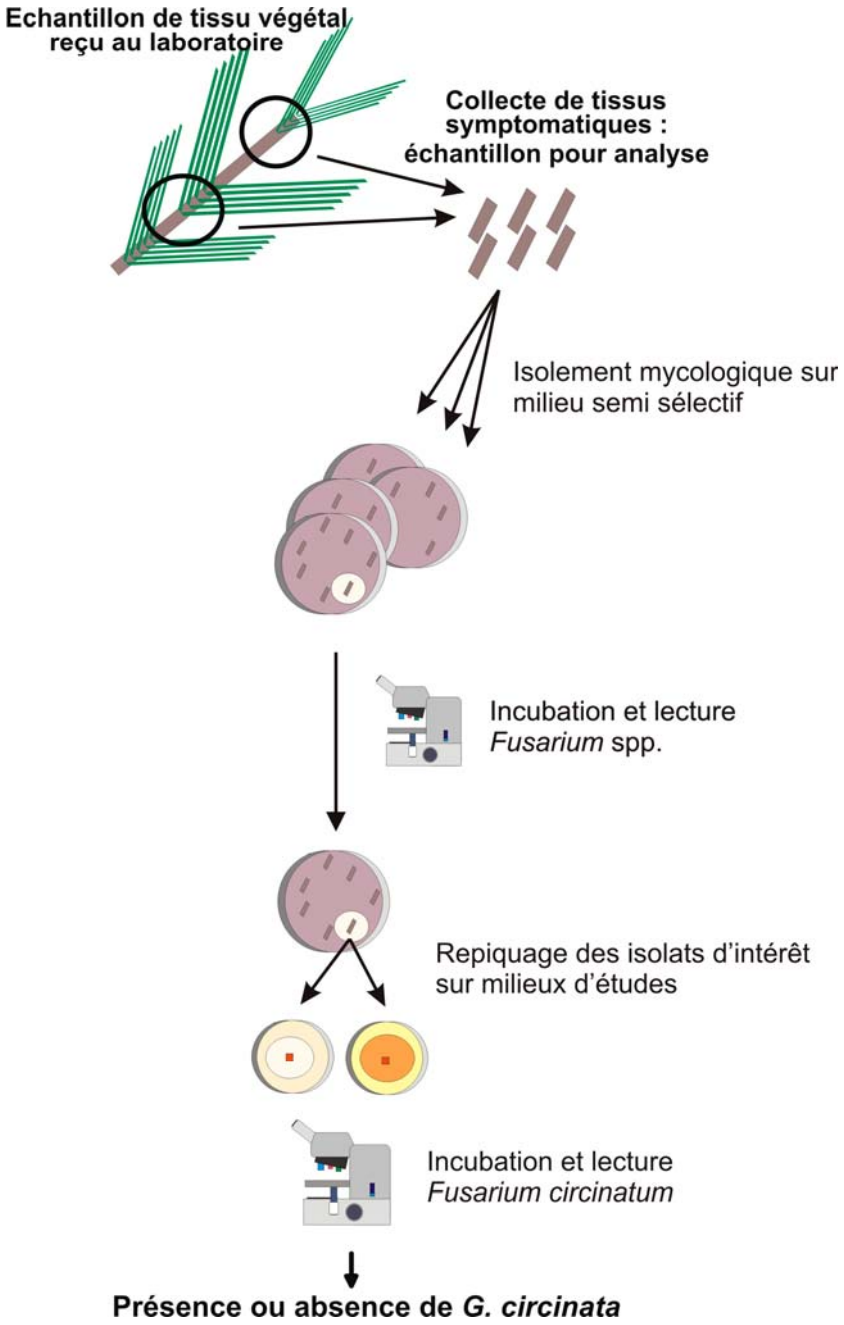
Grandeur de l'objet soumis à analyse.

La méthode s'applique sur tissus végétatifs présentant des symptômes (tissus nécrotiques de semis ou plantules, tissus sous corticaux de branches ou tronc, racines, etc.) de *Pinus* spp. et *Pseudotsuga menziesii*. Elle peut également s'appliquer sur des tissus ne présentant pas de symptôme apparent, en cas de suspicion d'infection latente.

Précaution(s) particulière(s) à prendre.
Le délai maximum entre la réception de l'échantillon et le début effectif de l'analyse doit être inférieur à 10 jours. L'échantillon devra pendant ce temps être conservé à 5±3°c.

L'exigence de confinement pour la manipulation de formes viables de cet agent pathogène à dissémination aérienne doit être de type NS3, dans la mesure où le laboratoire d'analyse est situé en zone indemne.

3. Présentation schématique de la détection



4. Produits et consommables

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

Eau osmosée ou eau distillée
Cette qualité d'eau est requise pour la fabrication des différents milieux de culture.

Consommables entrant dans la composition des milieux de culture

- Milieu Dichloran Chloramphenicol Peptone Agar adapté (DCPA) : cf. annexe 1
- Milieu Spezieller Nährstoffärmer Agar (SNA) : cf. Annexe 1
- Milieu Potato Dextrose Agar (PDA) : cf. annexe 1

Hypochlorite de Sodium [Au contact d'un acide dégage un gaz toxique. Provoque des brûlures. Après contact avec la peau se laver immédiatement et abondamment avec de l'eau. En cas d'accident ou de malaise consulter immédiatement un médecin (si possible lui montrer l'étiquette). Ne pas mélanger avec des acides]

La solution d'utilisation est une dilution de la solution mère à environ 1.5 % de chlore actif dans de l'eau du robinet. Une solution du commerce (eau de javel) diluée est acceptable.

Solution bleu coton ou acide fuchsine
Ces colorants dilués dans de l'acide lactique sont utilisées pour l'observation microscopique des structures fongiques.

Consommables plastiques

- Microcônes stériles 1000-5000 µl
- Boîtes de Petri stériles

Autres consommables

- Manches et lames de scalpels
- Lame porte objet pour microscopie
- Lamelles couvre objets pour microscopie
- Rouleau de bande adhésive transparente

5. Appareillage et matériel

En plus de l'appareillage courant d'un laboratoire de microbiologie, le matériel suivant est jugé nécessaire pour certaines phases de l'analyse:

- Poste de Sécurité Microbiologique de classe II équipé d'une source de flamme pour la stérilisation des instruments.
- Enceinte climatique thermostatée ou pièce à température contrôlée à 22±3°C
- Microscope optique équipé au minimum des objectifs x10, x20, et x40.
- Sécateur

6. Prise d'essai

Le laboratoire doit mettre en place une procédure adaptée à son environnement (locaux, infrastructures, …) visant à éviter tout risque de confusion entre échantillons et de contamination d'un échantillon par un autre.

La prise d'essai s'effectuera uniquement sur des tissus présentant des symptômes typiques d'une infection par *G. circinata* ou des symptômes douteux. En cas de suspicion d'infection latente sur jeune plant, la prise d'essai s'effectuera au dessus du niveau du collet, sous la forme d'un tronçon de la tige principale. Dans le cas d'analyse de jeunes semis, ces derniers sont rincés à l'eau courante pendant quelques secondes afin d'éliminer tout résidu de support de culture de l'appareil racinaire, avant de procéder au prélèvement de tissu.
Les prélèvements de tissu s'effectuent dans une atmosphère stérile, en utilisant des outils coupants stérilisés. Prélever préférentiellement dans la zone du chancre ou en limite de la zone nécrosée.
Pour un échantillon donné, réaliser une prise d'essai en ciblant les régions les plus pertinentes et prélever autant de fragments que nécessaire afin de maximiser les chances de détecter le parasite.

7. Etapes de l'analyse

7.1. Isolement sur milieu semi-sélectif

Les fragments de tissus récupérés sont stérilisés en surface par incubation de 1 à 2 minutes dans une solution titrant environ 1.5 % de chlore actif puis rincés dans de l'eau stérile. Les fragments sont ensuite placés sur du papier filtre et séchés par le flux stérile. Les fragments de tissus sont ensuite découpés en petits tronçons, puis déposés individuellement sur un milieu de culture DCPA, à raison de 5-10 implants par boîte de Petri.
Les boîtes de Petri sont ensuite incubées pendant 5 à 10 jours à 22±3°C.

7.2. Lecture des boîtes d'isolement et repiquage des *Fusarium* spp.

Après 5 à 10 jours d'incubation, les *Fusarium* spp. infectant les tissus incubés se sont bien développés sur le milieu semi-sélectif DCPA. Les cultures qui s'y développent apparaissent généralement blanches à saumon-rose très pâle, car ce milieu inhibe significativement la production de pigments par les champignons qui parviennent à s'y développer.
Le milieu étant semi-sélectif, les champignons du genre *Fusarium* vont se développer de manière conséquente sur le milieu (vitesse de croissance radiale >2 mm / jour et mycélium aérien abondant). Les colonies de *F. circinatum* présentent typiquement un aspect « poudreux » sur DCPA. Les autres genres de champignons peuvent croître mais vont présenter une vitesse de croissance radiale relativement faible (<2 mm / jour) et un mycélium aérien très peu abondant voire inexistant.
Les colonies sont ensuite observées à un grossissement de x 50 à x 200 en plaçant les boîtes de Petri fermées sur le plateau du microscope. Toutes les colonies présentant des microconidies disposées en fausse-tête sur des conidiophores érigés, assez courts et plus ou moins ramifiés seront identifiées et transférées individuellement sur un milieu SNA et un milieu PDA dans un PSM. Dans les cas où rigoureusement le même type de colonie se développe sur DCPA à partir d'un nombre important d'implants (infection sévère), il est admis de ne pas repiquer l'ensemble des colonies morphologiquement identiques, mais quelques unes d'entre elles.
Les colonies transférées sur PDA et SNA sont ensuite incubées pendant 5 à 10 jours à 22±3°C.

7.3. Identification de *Fusarium circinatum*, anamorphe de *G. circinata*

L'identification de *Fusarium circinatum* (anamorphe de *G. circinata* observé en culture pure) repose sur l'observation de l'ensemble des caractéristiques décrites par la littérature scientifique (Britz et al. 2002; Nirenberg and O'Donnell 1998; Pérez-Sierra et al. 2007).

Sur milieu PDA (observations macroscopiques uniquement):

- Colonie à marge entière,
- Mycelium aérien blanc et de type cotonneux (figure 1),
- Coloration de l'agar sous la culture : saumon virant au pourpre, voire au noir, vers le centre de la culture (figure 2) ou parfois disposée en « patches » concentriques.

Sur milieu SNA (observations microscopiques uniquement) :
Les isolats repiqués sur SNA sont tout d'abord observés à un grossissement de x 50 à x 200 en plaçant les boîtes de Petri fermées sur le plateau du microscope. Les boîtes sont observées à l'endroit et à l'envers.
Réaliser ensuite sous PSM un prélèvement de mycélium à l'aide d'une bande adhésive transparente, qui est déposée sur la surface du mycélium, et dont la face supérieure sera lissée à l'aide de la tête d'un coton tige, afin de bien mettre en contact la face collante avec les structures mycéliennes et la surface gélosée. La bande adhésive est ensuite retirée et la face collante est déposée sur une goutte de colorant pour observation directe au microscope. De cette façon, il est souvent plus facile d'observer les microconidies encore fixées à leur cellule conidiogène et gardant un éventuel agencement particulier

(fausse tête, chaînette). Lorsque l'isolat étudié en produit, les polyphialides sont plus facilement observables dans les parties jeunes de la culture (marge).

- Microconidies agrégées uniquement en fausse tête (figure 3),
- Conidiophores ramifiés présentant des mono- et des polyphialides (figure 4)
- Microconidies obovoïdes, majoritairement non septées ou avec occasionnellement un septum (figure 4)
- Chlamydospores absents
- Présence d'hyphes stériles, enroulés ou non enroulés de façon distincte (figures 5, 6, 7, 8)**.** Ces hyphes stériles plus ou moins enroulés sont une caractéristique exclusive de *F. circinatum* et d'une autre espèce, *F. pseudocircinatum.* Cette dernière espèce produit toutefois parfois des conidies en courtes chaînettes, ce qui la distingue de *F. circinatum*. Les hyphes stériles sont généralement observés directement dans l'agar, en observant directement la culture sur SNA au microscope (boîte retournée) à différentes profondeurs de champ.

Note : En cas de doute concernant l'identification de *F. circinatum* en culture pure, il est possible de confirmer l'identification *i)* en testant un extrait d'ADN de cette dernière par PCR en temps réel ou conventionnelle, comme décrit dans la méthode de détection de *Gibberella circinata* sur graines ou ii) en séquençant un gène d'intérêt phylogénétique (ex. translation elongation factor 1- alpha, *tef1* ;(GEISER 2004))



Figure 1: Aspect cultural aérien du stade anamorphe de *G. circinata* (*F. circinatum*) sur PDA (crédit photo R. Ioos)



Figure 2: Aspect cultural du stade anamorphe de *G. circinata* (*F. circinatum*) sur PDA, pigmentation particulière visible sous la culture (crédit photo R. Ioos)

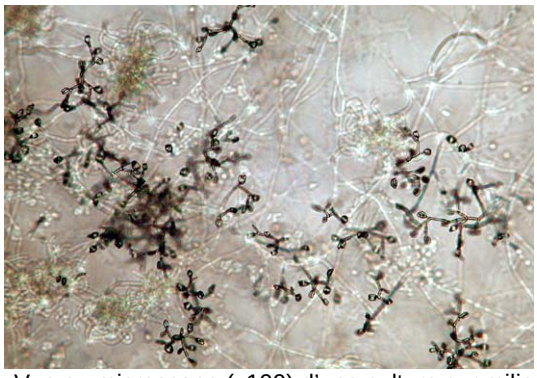


Figure 3 : Vue au microscope (x100) d'une culture sur milieu SNA de *Fusarium circinatum* présentant des conidiophores érigés portant des microconidies arrangées en fausse-tête. Sur la gélose sont visible des hyphes stériles enroulés typiques de *F. circinatum*.
(crédit photo R. Ioos)

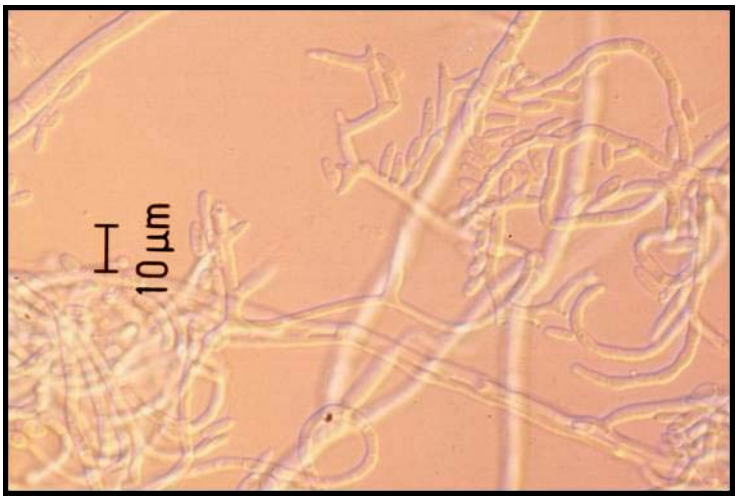


Figure 4 : conidiophores mono- et polyphialidiques et microconidies observés sur milieu SNA (crédit photo : J. Armengol)



Figure 5 : hyphes stériles typiquement enroulés ou non distinctivement enroulés observés chez *F. circinatum* cultivé sur milieu SNA (crédit photo A.-M. Pérez-Sierra)



Figure 6 : groupes d'hyphes stériles enroulés et conidiophores polyphialidiques produits par *F. circinatum* sur milieu SNA (grossissement x 400) (crédit photo R. Ioos)



Figure 7 : hyphes stériles enroulés produits par *F. circinatum* sur milieu SNA (grossissement x 400) (crédit photo R. Ioos)



Figure 8 : hyphes stériles non distinctivement enroulés observés chez *F. circinatum* cultivé sur milieu SNA (grossissement x 200) (crédit photo R. Ioos).-

8. Expression et formulation des résultats

- Si pour une prise d'essai au moins un des isolats repiqués présente toutes les caractéristiques de *G. circinata* en culture pure (*F. circinatum*), l'échantillon analysé est dit positif pour *Gibberella circinata*, suivant la méthode ci décrite.

- Si pour une prise d'essai aucun des isolats repiqués ne présente toutes les caractéristiques de *G. circinata* en culture pure (*F. circinatum*), l'échantillon analysé est dit négatif pour *Gibberella circinata,* suivant la méthode ci décrite.

9. Élimination des matériels susceptibles d'être contaminants

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

10. Conservation des reliquats de matériels utilisés

Sauf mention contraire explicite ou impossibilité technique avérée, les laboratoires doivent conserver les reliquats pertinents (nature, quantité et qualité) de matériel soumis à analyse, dans des conditions appropriées garantissant leur intégrité, jusqu'à au moins le dixième jour ouvrable suivant l'envoi au demandeur d'un rapport d'analyse concluant à la non mise en évidence de l'organisme recherché. Ce délai imposé est destiné à laisser le temps au demandeur de l'analyse de contester le résultat auprès du laboratoire (ce qui prolonge la conservation du reliquat jusqu'à l'issue de la contestation) et éventuellement de demander une analyse contradictoire.
Dans le cas d'un résultat autre que la non mise en évidence de l'organisme recherché, et sauf indications plus précises dans la méthode, l'ensemble des reliquats pertinents doit être conservé pendant une durée minimale de 12 mois, sauf pour les parties éventuellement transmises à un autre laboratoire agréé ou de référence, à qui est alors transférée la charge de conservation des reliquats. Le laboratoire national de référence peut demander que tout ou partie de ces reliquats lui soient transmis, aux frais des laboratoires agréés ou reconnus, dans le cadre des missions qui lui sont confiées.

LISTE DES DOCUMENTS OFFICIELS APPELES PAR LA METHODE

Référence	Titre
Décret 2006-7 du 4 janvier 2006	Décret 2006-7 du 4 janvier 2006 relatif aux laboratoires nationaux de référence, ainsi qu'à l'agrément et à la reconnaissance des laboratoires d'analyses dans le domaine de la santé publique vétérinaire et de la protection des végétaux, et modifiant le code rural
Arrêté ministériel du 19 décembre 2007	Arrêté ministériel du 19 décembre 2007 fixant les conditions générales d'agrément des laboratoires d'analyses dans le domaine de la santé publique vétérinaire et de la protection des végétaux
Norme XP V03 - 043	Exigences générales pour la réalisation d'analyses utilisant la biologie moléculaire pour la détection et l'identification d'organismes pathogènes, d'altération et ravageurs des végétaux et produits dérivés
Dossier d'évaluation Gcircinata_2010	Développement, évaluation et validation de 3 méthodes de détection du champignon *Gibberella circinata* sur tissus végétatifs et semences de *Pinus* spp. et *Pseudotsuga menziesii*
REP 001	Répertoire des recettes en vigueur au LNPV
GLO 001	Glossaire des termes techniques en vigueur au LNPV

BIBLIOGRAPHIE SUCCINCTE

Andrews S, Pitt JI, 1986. Selective medium for isolation of Fusarium species and dematiaceous hyphomycetes from cereals. *Applied And Environmental Microbiology* 51, 1235-1238.

Britz H, Coutinho TA, Wingfield MJ, Marasas WFO, 2002. Validation of the description of *Gibberella circinata* and morphological differentiation of the anamorph *Fusarium circinatum*. *Sydowia* 54, 9-22.

Geiser DM, 2004. FUSARIUM-ID v. 1.0: a DNA sequence database for identifying Fusarium. *European Journal of Plant Pathology* 110, 473-479.

Gerlach W, Nirenberg HI, 1982. *The genus Fusarium -- a pictorial atlas*.

Ioos R, Belhadj A, Menez M, 2004. Occurrence and distribution of *Microdochium nivale* and *Fusarium* species isolated from barley, durum and soft wheat grains in France from 2000 to 2002. *Mycopathologia* 158, 351-362.

Nirenberg HI, O'Donnell K, 1998. New *Fusarium* species and combinations within the *Gibberella fujikuroi* species complex. *Mycologia* 90, 434-458.

Pérez-Sierra A, Landeras E, León M, Berbegal M, García-Jiménez J, Armengol J, 2007. Characterization of *Fusarium circinatum* from *Pinus* spp. in northern Spain. *Mycological Research* 111, 832-839.

ANNEXE I

Composition des différents milieux de culture.

Milieu DCPA (Dichloran Chloramphenicol Peptone Agar)

(Andrews and Pitt 1986; Ioos et al. 2004).

Avant utilisation, ce milieu peut être stocké jusqu'à une semaine à température ambiante et à l'abri de la lumière directe ou jusqu'à 3 mois à 5±3°C à l'abri de la lumière directe.

Pour un litre de milieu :

- peptone bactériologique : 15.0±1.0 g
- K_2HPO_4 : 1.0±0.1 g
- $MgSO_4.7H_2O$: 0.5±0.1 g
- Chloramphénicol[1] : 2.0±0.1 ml d'une solution éthanolique*
- dichloran [2] (2-6-dichloro-4-nitroaniline) en solution éthanolique** : 1.0±0.1 ml. [nocif en cas d'ingestion]
- crystal violet en solution aqueuse*** : 1.0±0.1 ml
- Agar : 15.0±1.0 g
- H_2O distillée ou osmosée : 1000±10 ml

* : 10.0±0.1 g de chloramphenicol dans 100±2 ml d'éthanol, conservable à 5±3°C pendant 3 mois.
** : 0.20±0.01 g de dichloran dans 100±2 ml d'éthanol, conservable à 5±3°C pendant 6 mois.
*** : 0.05±0.01 g de crystal violet dans 100±2 ml d'eau distillée ou osmosée, conservable à 5±3°C pendant 6 mois.

Milieu SNA (Spezieller Nährstoffärmer Agar)

(Gerlach and Nirenberg 1982)

Avant utilisation, ce milieu peut être stocké jusqu'à une semaine à température ambiante et à l'abri de la lumière directe ou jusqu'à 3 mois à 5±3°C à l'abri de la lumière directe.

Pour un litre de milieu :

- K_2HPO_4 : 1.0±0.1 g
- KNO_3 : 1.0±0.1 g
- $MgSO_4.7H_2O$: 0.5±0.1 g
- KCl : 0.5±0.1 g
- Glucose : 0,20±0.05g
- Saccharose : 0,20±0.05 g
- Agar : 20±1 g
- H_2O distillée ou osmosée : 1000±10 ml

Milieu PDA (Potato Dextrose Agar)

[1] Peut causer le cancer. Peut causer des altérations génétiques héréditaires. Risques possibles pendant la grossesse d'effets néfastes pour l'enfant. Peut entraîner une sensibilisation par inhalation et contact avec la peau. En cas d'accident ou de malaise, consulter immédiatement un médecin (si possible lui montrer l'étiquette). Porter un vêtement de protection approprié, des gants et un appareil de protection des yeux/ du visage.
[2] Idem [1]

Avant utilisation, ce milieu peut être stocké jusqu'à une semaine à température ambiante et à l'abri de la lumière directe ou jusqu'à 3 mois à 5±3°C à l'abri de la lumière directe.

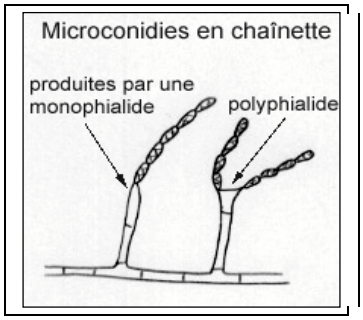
Pour un litre de milieu :

- PDA en poudre prêt à l'emploi, de préférence de marque Difco : 39±1 g
- H_2O distillée ou osmosée : 1000±10 ml

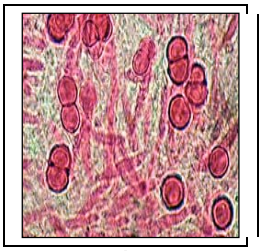
ANNEXE II

Glossaire.

Chaînette (microconidies en -) : se dit du regroupement en chaîne de microconidies (conidies les unes sous les autres) produites de façon basifuge par une phialide et provenant d'une même pore.

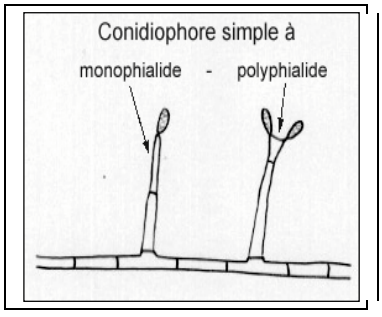


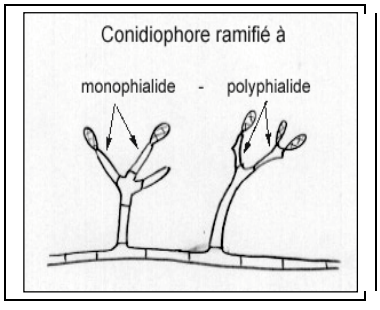
Chlamydospore : forme de repos, de résistance, très fréquente chez les champignons, constituée de portions d'hyphes où le cytoplasme s'est condensé et généralement entouré d'une paroi épaisse et mélanisée.



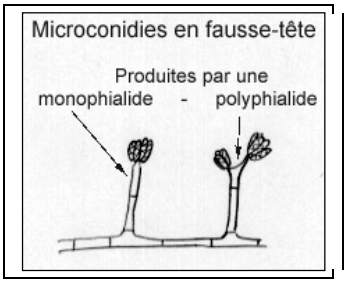
Chlamydospores à surface rugueuse
de *F. equiseti*

Conidiophore : structure, simple ou ramifiée, située entre l'hyphe végétative et les conidies, formée par la (les) cellule(s)-mère(s) (phialides), l'hyphe fertile et ses ramifications éventuelles.





Fausse tête (microconidies en -) : se dit du regroupement en amas de microconidies produites par une phialide et provenant d'un même pore. Les microconidies en fausse tête peuvent ou non être incluses dans une gouttelette.

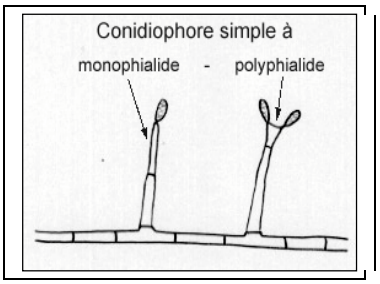


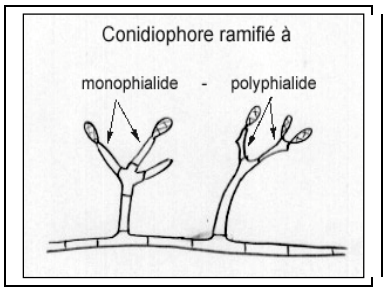
Microconidie : dans le cas où deux formes conidiennes coexistent chez un deutéromycète, les conidies les plus petites sont les microconidies. Certains auteurs donnent le nom de microconidies aux conidies produites dans le mycélium aérien, quelles que soient leur taille et leur cloisonnement.

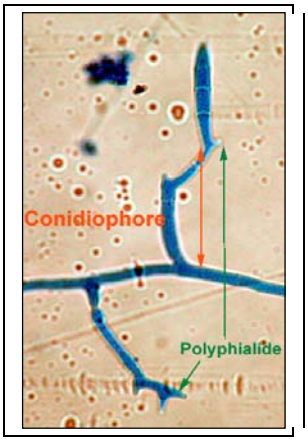
Phialide : cellule-mère produisant des conidies de façon entéroblastique (par bourgeonnement avec continuité entre la couche interne de la cellule-mère et la paroi conidienne) sans allongement lors des conidiogénèses successives. On distingue :

Monophialide : phialide ne présentant qu'un unique pore par lequel est produite la ou les conidies

Polyphialide : phialide présentant plusieurs pores par lesquels sont produites une ou plusieurs conidies. A ne pas confondre avec un conidiophore ramifié à monophialide.







Polyphialides sur conidiophore simple

Crédits tous dessins et photographies : R. IOOS (LNPV-Station de Mycologie)

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

Laboratoire national de la protection des végétaux,
7 rue Jean Dixméras, 49044 ANGERS cedex 01
lnpv.sdqpv.dgal@agriculture.gouv.fr

Ce document est édité par :

Ministère de l'alimentation, de l'agriculture et de la pêche
Direction générale de l'alimentation
Service de la prévention des risques sanitaires de la production primaire
Sous-direction de la qualité et de la protection des végétaux
251 rue de Vaugirard, 75732 PARIS Cedex 15
www.agriculture.gouv.fr

auprès de qui toute autre correspondance peut être adressée.