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/ 2010-02-031
MOD10.22 B 29/10/09

NOTE DE SERVICE

DGAL/SDQPV/N2010-8054

Date: 23/02/2010

Date de mise en application :	Immédiate
Abroge et remplace :	La méthode MF/97/06 b « détection de *Mycosphaerella dearnessii* ou *M. pini* sur aiguilles par mise en chambre humide et observation microscopique de l'anamorphe (*Lecanosticta acicola* ou *Dothistroma septospora*) » parue au journal officiel du 2 juin 2005
Nombre d'annexe :	1

Objet : Méthode d'analyse MOA 002, pour la détection de *Dothistroma pini* Hullbary, *Mycosphaerella pini* e. Rostrup (anamorphe *Dothistroma septosporum* (Dorog.) M. Morelet) et *Mycosphaerella dearnessii* Barr dans une matrice d'aiguilles de conifères par la technique d'amplification par polymérisation en chaîne en temps réel quadruplex.

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 *Dothistroma pini, Mycosphaerella pini* et *Mycosphaerella dearnessii.*

Mots-clés : Mycologie - méthode officielle – analyses - détection - *Dothistroma pini* - *Mycosphaerella pini* - *Mycosphaerella dearnessii*, conifères.

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 *Mycosphaerella dearnessii* (anamorphe *Lecanosticta acicola* (Thümen) H. Sydow) et *Mycosphaerella pini*, champignons phytopathogènes causant des maladies des aiguilles sur les conifères.

Mycosphaerella dearnessii est l'agent des taches brunes des aiguilles et est classé comme organisme nuisible réglementé par l'UE (Directive CE/2000/29, annexe IIAI). *Mycosphaerella pini* est l'agent de la maladie des bandes rouges des aiguilles et est classé comme organisme nuisible réglementé par l'UE (Directive CE/2000/29, annexe IIAII). Cette dernière entité a été récemment divisée en deux entités génétiquement et morphologiquement distinctes dont les formes imparfaites sont *Dothistroma septosporum* (téléomorphe *Mycosphaerella pini sensu* Rostrup) et *Dothistroma pini* (téléomorphe inconnu) (Barnes et al. 2004). Il est à noter que des cas de co-infection d'un même échantillon pour analyse par deux des trois parasites sont décrits dans la littérature (Ioos et al., 2009).

La méthode présentée en annexe, repose sur l'emploi de la technique d'amplification par polymérisation en chaîne en temps réel (real-time PCR). L'utilisation d'amorces et de sondes marquées, respectivement spécifiques de *M. dearnessii*, de *D. septosporum* et de *D. pini* permet de détecter et d'amplifier une région discriminante de l'ADN génomique pour chacun de ces champignons. La détection s'effectue dans un extrait d'ADN total obtenu à partir de prises d'essai de tissus d'aiguilles broyés.

Vous trouverez en annexe à cette note d'information la méthode officielle d'analyse pour *Dothistroma pini*, *Mycosphaerella pini* et *Mycosphaerella dearnessii*.

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 *Dothistroma pini*, *Mycosphaerella pini* et *Mycosphaerella dearnessii*

Réf. : MOA 002 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 002	Consultation publique		Validité	
Numéro de la version	Début	Fin	Début	Fin
MF/97/06 b	Mars 1997	Sans objet	Mars 1997	Mars 2010
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 11
4. Produits et consommables 11
   4.1. Tampons 12
   4.2. Autres réactifs et consommables 12
5. Appareillage et matériel 13
6. Contrôles et témoins 14
7. Prise d'essai 15
8. Etapes de l'analyse 15
   8.1. Broyage des prises d'essai et extraction de l'ADN total 15
   8.2. Test de détection par PCR en temps réel duplex 16
9. Résultats 17
   9.1. Validation de l'analyse 17
   9.2. Interprétation et formulation des résultats 18
10. Élimination des matériels susceptibles d'être contaminants 19
11. Conservation des reliquats de matériels utilisés 19

LISTE DES DOCUMENTS OFFICIELS APPELES PAR LA METHODE **20**

BIBLIOGRAPHIE SUCCINCTE **21**

ANNEXE I **22**

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) et l'UMR 1136 de l'INRA de Champenoux visant à mettre au point une technique moléculaire de détection des champignons *Dothistroma pini* (téléomorphe inconnu), *Dothistroma septosporum* (téléomorphe *Mycosphaerella pini*) et *Lecanosticta acicola* (téléomorphe Mycosphaerella dearnessii) (loos et al. 2010).

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

La méthode MF/97/06 b « détection de *Mycosphaerella dearnessii* ou *M. pini* sur aiguilles par mise en chambre humide et observation microscopique de l'anamorphe (*Lecanosticta acicola* ou *Dothistroma septospora*) » a été intégralement revue pour permettre l'utilisation de nouveaux outils basés sur des marqueurs moléculaires, beaucoup plus fiables en termes de sensibilité et qui permettent à présent de discriminer les deux espèces *D. pini* et *D. septosporum*, anciennement rassemblées sous le nom de la forme téléomorphe *Mycosphaerella pini* (Barnes et al. 2004).

MODIFICATIONS

Sans objet (première version publiée).

AMELIORATIONS

Sans objet (première version publiée).

DESCRIPTION DE LA METHODE

Détection de *Dothistroma pini* Hullbary, *Mycosphaerella pini* e. Rostrup (anamorphe *Dothistroma septosporum* (Dorog.) M. Morelet) et *Mycosphaerella dearnessii* Barr dans une matrice d'aiguilles de conifères par la technique d'amplification par polymérisation en chaîne en temps réel quadruplex.

1. Objet.

Mycosphaerella dearnessii (anamorphe *Lecanosticta acicola* (Thümen) H. Sydow) et *Mycosphaerella pini* sont des champignons phytopathogènes causant des maladies des aiguilles sur les conifères. *M. dearnessii* est l'agent des taches brunes des aiguilles et est classé comme parasite réglementé par l'UE (Directive CE/2000/29, annexe IIAI). *Mycosphaerella pini* est l'agent de la maladie des bandes rouges des aiguilles et est classé comme parasite réglementé par l'UE (Directive CE/2000/29, annexe IIAII). Cette dernière entité a été récemment divisée en deux entités génétiquement et morphologiquement distinctes dont les formes imparfaites sont *Dothistroma septosporum* (téléomorphe *Mycosphaerella pini sensu* Rostrup) et *Dothistroma pini* (téléomorphe inconnu) (Barnes et al. 2004). Il est à noter que des cas de co-infection d'un même échantillon pour analyse par deux des trois parasites sont décrits dans la littérature (Ioos et al. 2010).

La méthode repose sur l'emploi de la technique d'amplification par polymérisation en chaîne en temps réel (real-time PCR). L'utilisation d'amorces et de sondes marquées, respectivement spécifiques de *M. dearnessii*, de *D. septosporum* et de *D. pini* permet de détecter et d'amplifier une région discriminante de l'ADN génomique pour chacun de ces champignons. La détection s'effectue dans un extrait d'ADN total obtenu à partir de prises d'essai de tissus d'aiguilles broyés.
L'utilisation en quadruplex real-time PCR d'une autre combinaison de sonde et d'amorce (18S uni-F/-R/-P) permet d'évaluer simultanément la qualité des extraits d'ADN testés.

2. Domaine d'application.

Objets susceptibles d'être soumis à analyse.
Cette méthode concerne les aiguilles de *Pinus* spp., *Pseudotsuga menziesii*, *Larix decidua* et *Picea abies*. 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 aiguilles de *Pinus nigra*. Elle est toutefois utilisable sur les aiguilles des autres essences hôtes citées plus haut.

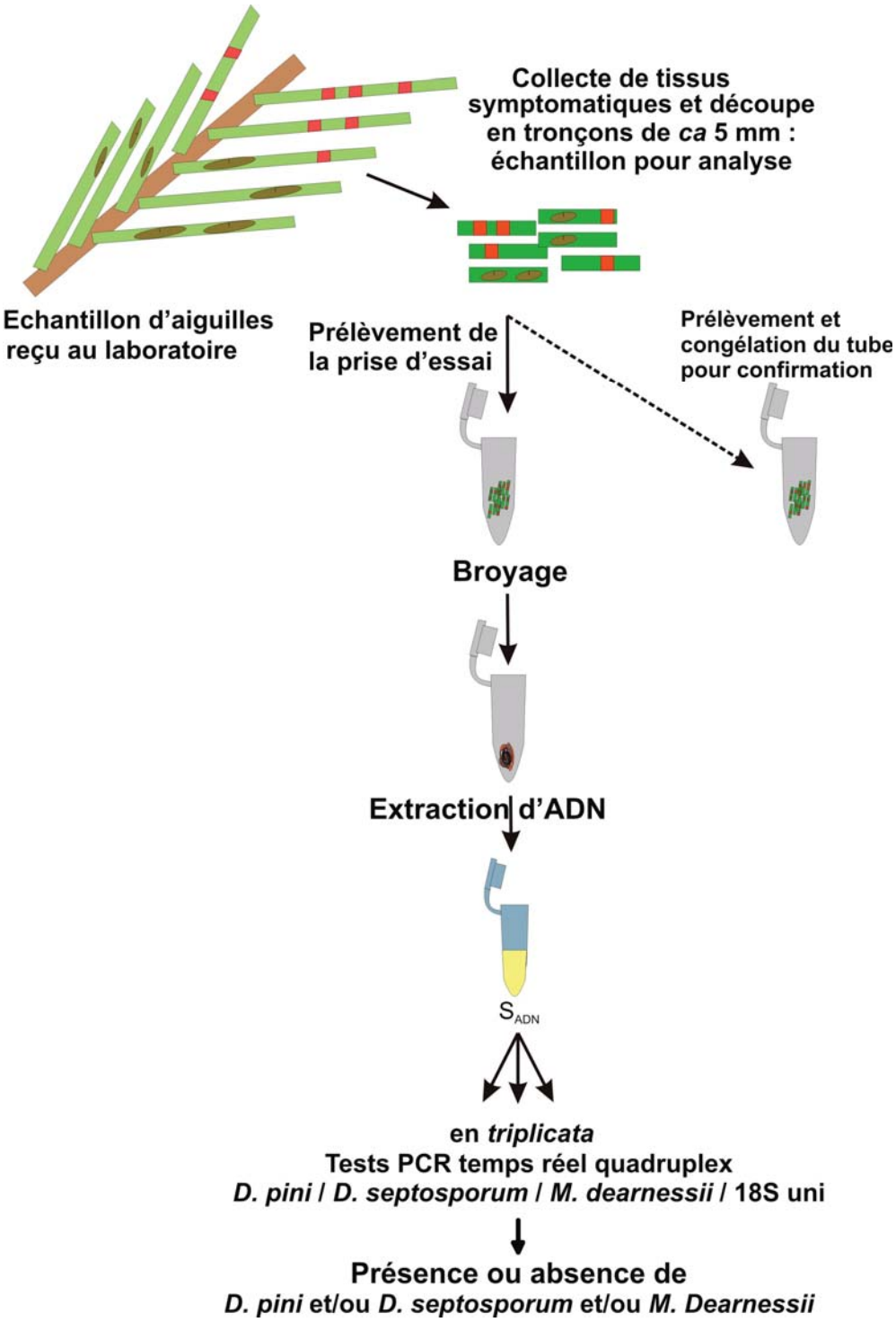
Grandeur de l'objet soumis à analyse.
La méthode s'applique uniquement sur des aiguilles de conifères. Les échantillons pour analyse peuvent être constitués d'aiguilles seules ou encore attachées à leur rameau.

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 30 jours. L'échantillon devra pendant ce temps être conservé à 5±3°c. Les prises d'essai en microtubes peuvent être conservées congelées jusqu'à 6 mois avant analyse.

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.

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.

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. 2010a) 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')
M. dearnessii	MDtef-F1[a]	CCTCCTTCATCTTCCCCTTC
	MDtef-R1[a]	TGTGGGAGATAGCGTTGTCA
	MDtef-P1[a]	Cy5-CAAGCACTCTTGGAACACACCGC-BHQ3/2
D. pini	DPtef-F1[a]	ACAGCAATCACACCCTTGC
	DPtef-R1[a]	TCATGTGCTCAATGTGAGATGT
	DPtef-P1[a]	FAM-CCCCAGCCGATTACACGACG-BHQ1
D. septosporum	DStub2-F1[a]	CGAACATGGACTGAGCAAAA
	DStub2-R1[a]	TGCCTTCGTATCTGCATTTC
	DStub2-P1[a]	ROX-TGGAATCCACAGACGCGTCA-BHQ2
Plante/champignon	18S uni-F[b]	GCAAGGCTGAAACTTAAAGGAA
	18S uni-R[b]	CCACCACCCATAGAATCAAGA
	18S uni-P[b]	JOE-ACGGAAGGGCACCACCAGGAGT-BHQ1

[a] (Ioos et al. 2010)
[b] (Ioos et al. 2009)

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. 2010a) lors d'essais préliminaires effectués sur extraits d'ADN total d'isolats référencés de chacun des organismes cibles, 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.
Ce réactif peut être déjà compris dans un pré-mix commercial (cf. description « Pré-mix commercial »).

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. Ce réactif peut être déjà compris dans un pré-mix commercial.

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. Ces réactifs peuvent être déjà compris dans un pré-mix commercial.

Tampon de l'ADN polymérase

Il est obligatoire d'utiliser le tampon de polymérase fourni avec cette dernière par le fabricant. Ce réactif peut être déjà compris dans un pré-mix commercial.

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 chacun des parasites cible, dans les conditions d'utilisation décrites par la présente méthode.

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 » , « JOE », « Cy5 » et « ROX » 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 un des parasites cibles ne nécessiteront pas systématiquement de contrôle de la qualité d'ADN. Ce test sera réalisé dans la même réaction que le test de détection simultané des trois parasites (quadruplex). En revanche, 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 (aiguilles de *Pinus* sp.) dans ses propres conditions.
- **Un témoin négatif de processus ($T-_{PROC}$) ou un témoin négatif d'extraction ($T-_{extr.}$)** sera préparé pour toute série d'extractions. Une prise d'échantillon "vide" (= "$T-_{extr}$"), 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 d'aiguilles de *Pinus* reconnu non contaminé par aucun les trois parasites cibles (témoin négatif de processus, $T-_{PROC}$). L'un ou l'autre sera testé en *triplicata* lors de chaque réaction de PCR en temps réel quadruplex 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 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** (**$T+_{LOD}$**) correspondant à chacun des parasites cibles sera systématiquement testé en *triplicata* lors de chaque réaction de PCR en temps réel quadruplex. 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 chacun des 3 parasites cibles puisse avoir été détectée dans un échantillon par ce protocole. Ces $T+_{LOD}$ sont chacun constitués d'une solution calibrée d'ADN génomique d'une souche référencée de l'organisme cible ou d'une solution calibrée de plasmides bactériens dans lesquels est clonée la cible du test PCR spécifique. Ces $T+_{LOD}$ doivent être caractérisés 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 quadruplex. 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 (2^{eme} 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 sur des tissus présentant des symptômes typiques d'une infection par *M. dearnessii* (jaunissement d'aiguille + taches brunes), *D. pini ou D. septosporum* (jaunissement d'aiguilles + bandes rouges pour les deux espèces) ou éventuellement des symptômes douteux. Des photos de symptômes caractéristiques sont visibles dans le protocole OEPP « *Mycosphaerella dearnessii* and *Mycosphaerella pini* » (EPPO 2008), consultable et téléchargeable gratuitement en ligne sur le site web du « EPPO bulletin ».

Pour un échantillon pour analyse donné, des aiguilles présentant des symptômes typiques de maladie des taches brunes ou de maladie des bandes rouges seront prélevées. De ces aiguilles, des tronçons d'environ 5 mm contenant des symptômes typiques (taches brunes ou/et bandes rouges) ou éventuellement douteux seront découpés à l'aide d'un scalpel stérile. Transférer au maximum 15 tronçons d'aiguilles dans un microtube stérile de 2 ml (moins si on ne dispose pas de suffisamment de portions d'aiguilles avec des symptômes typiques). Ceci constituera la prise d'essai.
En cas d'absence de symptômes typiques bien visibles, prélever alors des tronçons d'aiguilles dans des parties jaunissantes, en conservant lorsque c'est possible une marge de tissu vert.

A cette étape, et lorsque la quantité d'aiguilles symptomatiques le permet, 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 de l'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. 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.
4. Centrifuger le microtube quelques secondes après le broyage pour faire descendre l'échantillon au fond du tube et réduire la mousse.
5. Incuber chaque tube pendant la durée et 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.
6. A la fin de l'incubation centrifuger les tubes environ 2 min à environ 11 000 g. Prélever le surnageant pour poursuivre l'extraction.
7. 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.
8. 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 duplex

Préparation et distribution du mélange réactionnel de détection *D. pini*, *D. septosporum et M. dearnessii*.
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 ou tampon de « pré-mix »*	1 X
Chlorure de Magnésium	5 mM
Amorce MDtef-F1	0.3 µM
Amorce MDtef-R1	0.3 µM
Sonde MDtef-P1	0.1 µM
Amorce DPtef-F1	0.3 µM
Amorce DPtef-R1	0.3 µM
Sonde DPtef-P1	0.1 µM
Amorce DStub-F1	0.3 µM
Amorce DStub-R1	0.3 µM
Sonde DStub-P1	0.1 µM
Amorce 18S uni-F	0.3 µM
Amorce 18S uni-R	0.3 µM
Sonde 18S uni-P	0.1 µM
dNTPs mix*	4 x 200 µM**
Polymérase à ADN de type Hotstart	0.025 U/µl**

* le pré-mix peut en outre contenir de l'Uracil-N-glycosylase (UNG) et le dNTP mix contenir de l'Uracile, pour prévenir les autocontaminations provenant des réactions d'amplification précédentes, mais sans caractère obligatoire. Dans ce cas, utiliser les concentrations et suivre les conditions d'emploi recommandées par le fournisseur.
** ou concentration fixée et optimisée par le fournisseur si un pré-mix du commerce est utilisé.

Il est possible de préparer à l'avance une solution « cocktail » des 4 amorces sens, 4 amorces antisens et 4 sondes et de l'utiliser comme solution de travail pour préparation du mélange maître. Cette dernière pourra être décongelée à chaque série d'analyse et recongelée sans affecter la qualité du résultat, tout en minimisant les risque d'oubli ou d'erreurs de pipetage (Ioos et al. 2010).

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 celle-ci n'est pas incluse dans 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 témoins 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 quadruplex *D. pini*, *D. septosporum et M. dearnessii,* 18S uni.

Les différents paramètres de la PCR en temps réel pour la détection de *D. pini*, *D. septosporum et M. dearnessii* sont les suivants (loos et al. 2010) :

Etape		Température de consigne	Durée programmée	Nombre de cycles
0*	*Activation de l'UNG*	*Suivre les préconisations du fournisseur*	*Suivre les préconisations du fournisseur*	*1*
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	**60°C**	**55 sec puis mesure de la fluorescence FAM, JOE, ROX, Cy5**	

* étape facultative

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

9. Résultats

9.1. Validation de l'analyse

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.
Pour chaque fluorophore, l'opérateur détermine une ligne de seuil (« threshold line ») qui constituera la limite minimale de fluorescence 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 $T+_{LOD}$ ou du $T+_{18S\ frêne}$ 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 cinétique de 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 $T-_{PROC}$ ou $T-_{extr}$ n'a généré de fluorescence FAM, ROX et Cy5 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, ROX et Cy5 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, ROX et Cy5 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 *D. pini, D. septosporum et M. dearnessii.*

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.

9.2. 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 espèce-spécifique, observer pour chaque cible 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 de la S_{ADN} de la prise d'essai sont positifs pour un test spécifique (*D. pini*, *D. septosporum ou M. dearnessii)* la prise d'essai considérée est dite positive pour l'organisme cible considéré. Le résultat sera exprimé par une phrase du type « Présence de l'organisme cible « dans l'échantillon analysé » en citant la méthode ci-écrite.
b) Si un ou deux réplicats parmi les trois de la S_{ADN} de la prise d'essai sont positifs pour l'un des tests spécifiques (*D. pini*, *D. septosporum ou M. dearnessii*), refaire le test PCR quadruplex en *triplicata*.
c) Si aucun des réplicats de la S_{ADN} de la prise d'essai n'est positif pour un ou plusieurs des tests spécifiques (*D. pini*, *D. septosporum* ou *M. dearnessii)* et la S_{ADN} est positive pour le test 18S uni, la prise d'essai est dite négative pour le ou les organismes cibles considérés. Le résultat sera alors exprimé par une phrase du type « Résultat négatif pour la détection de » l'organisme cible « 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 la S_{ADN} de la prise d'essai n'est positif pour les trois tests spécifiques (*D. pini*, *D. septosporum et M. dearnessii*) et que la S_{ADN} correspondante est aussi négative pour le test 18S uni, la prise d'essai est dite « non utilisable» pour la recherche de *D. pini*, *D. septosporum et M. dearnessii*. 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 exprimé par « résultat indéterminé » selon la méthode ci décrite, et mentionner la cause de l'indétermination.

[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

Le diagramme décisionnel présenté en annexe I résume 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 Dpini_Dseptosporum_Mdearnessii_2010	Développement, évaluation et validation d'une méthode de détection des champignons *Dothistroma pini*, *Dothistroma septosporum* et *Mycosphaerella dearnessii* sur aiguilles de conifères.
REP 001	Répertoire des recettes en vigueur au LNPV
GLO 001	Glossaire des termes techniques en vigueur au LNPV

BIBLIOGRAPHIE SUCCINCTE

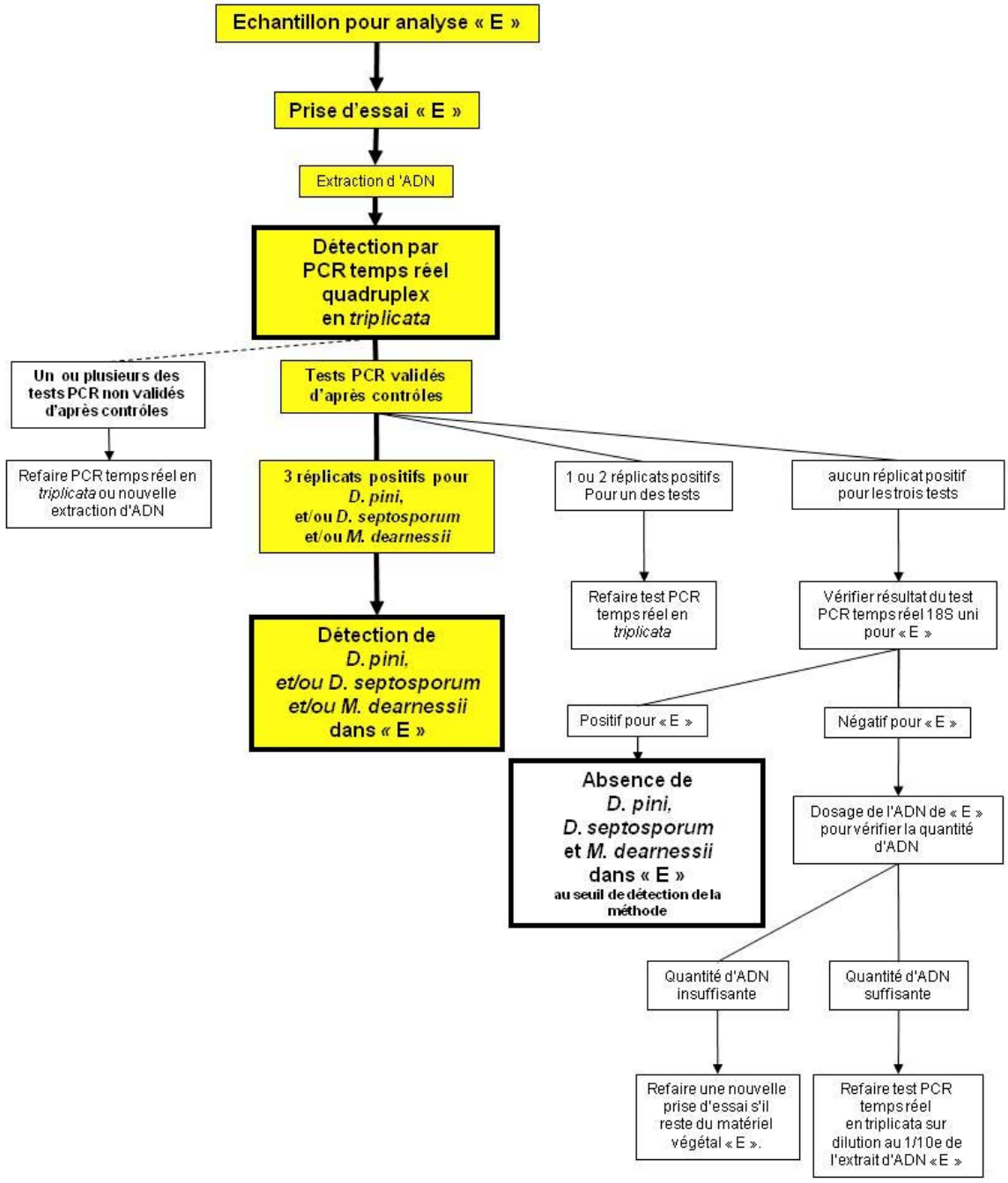
Barnes I, Crous PW, Wingfield BD, Wingfield MJ, 2004. Multigene phylogenies reveal that red band needle blight of *Pinus* is caused by two distinct species of *Dothistroma*, *D. septosporum* and *D. pini*. *Studies in Mycology* 50, 551-565.

EPPO, 2008. *Mycosphaerella dearnessii* and *Mycosphaerella pini*. *EPPO Bulletin* 38, 349-362.

Ioos R, Fabre B, Saurat C, Fourrier C, Frey P, Marçais B, 2010. Development, comparison, and validation of real-time and conventional PCR tools for the detection of the fungal pathogens causing brown spot and red band needle blights of pines. *Phytopathology* 100: 105-114.

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.

ANNEXE I


Echantillon pour analyse « E »
Prise d'essai « E »
Extraction d 'ADN
Détection par PCR temps réel quadruplex en triplicata
Un ou plusieurs des tests PCR non validés d'après contrôles
Refaire PCR temps réel en triplicata ou nouvelle extraction d'ADN
Tests PCR validés d'après contrôles
3 réplicats positifs pour D. pini, et/ou D. septosporum et/ou M. dearnessii
Détection de D. pini, et/ou D. septosporum et/ou M. dearnessii dans « E »
1 ou 2 réplicats positifs Pour un des tests
Refaire test PCR temps réel en triplicata
aucun réplicat positif pour les trois tests
Vérifier résultat du test PCR temps réel 18S uni pour « E »
Positif pour « E »
Absence de D. pini, D. septosporum et M. dearnessii dans « E » au seuil de détection de la méthode
Négatif pour « E »
Dosage de l'ADN de « E » pour vérifier la quantité d'ADN
Quantité d'ADN insuffisante
Quantité d'ADN suffisante
Refaire une nouvelle prise d'essai s'il reste du matériel végétal « E ».
Refaire test PCR temps réel en triplicata sur dilution au 1/10e de l'extrait d'ADN « E »

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.