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/ 2010-04-017
MOD10.22 B 29/10/09

NOTE DE SERVICE

DGAL/SDQPV/N2010-8121

Date: 28/04/2010

Date de mise en application :	Immédiate
Abroge et remplace :	La méthode VL/05/12 a «Détection des phytoplasmes de l'enroulement chlorotique de l'abricotier, de la prolifération du pommier et du dépérissement du poirier sur rameaux et racines, par la technique d'amplification génique PCR (Polymerase Chain Reaction). Espèces ligneuses des genres *Prunus*, *Malus et Pyrus*» parue au journal officiel du 2 juin 2005
Date limite de réponse :	immédiate
Nombre d'annexe :	1
Degré et période de confidentialité :	Sans objet

Objet : Méthode d'analyse MOA 004, pour la Détection des phytoplasmes de l'enroulement chlorotique de l'abricotier, de la prolifération du pommier et du dépérissement du poirier

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 des phytoplasmes de l'enroulement chlorotique de l'abricotier, de la prolifération du pommier et du dépérissement du poirier

Mots-clés : Phytoplasmes - méthode officielle – analyses - détection - Abricotier - Pommier - Poirier - Apricot chlorotic leafroll phytoplasma - Peach chlorotic leafroll phytoplasma - Apple proliferation phytoplasma - Pear decline phytoplasma

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

La présente note a pour objet la publication officielle de la méthode de détection des phytoplasmes de l'enroulement chlorotique de l'abricotier, de la prolifération du pommier et du dépérissement du poirier sur rameaux et racines.

La maladie de l’enroulement chlorotique de l’abricotier, quoique présente depuis longtemps sur les abricotiers du Sud-Est de la France et dans les vergers de pruniers japonais du Sud Ouest, a vu son impact augmenter d’année en année. C’est une des maladies causant le plus de dégâts sur les arbres fruitiers à noyaux, en particulier l’abricotier et le pêcher. La maladie est connue en France depuis 1920, pour provoquer des apoplexies sur abricotier, mais le phytoplasme causal (European Stone fruit yellows ; Apricot chlorotic leafroll phytoplasma ; Peach chlorotic leafroll phytoplasma) n'a été observé et identifié qu'en 1973.

La maladie de la prolifération du Pommier est une des maladies à phytoplasme (Apple proliferation phytoplasma) les plus importantes du pommier, qui attaque pratiquement tous les cultivars, en réduisant la taille (d'environ 50%), le poids (de 63-74%) et la qualité des fruits.

Le dépérissement du poirier dû au phytoplasme (Pear decline phytoplasma) représente la plus grave maladie de dégénérescence du poirier. Elle est présente de façon sporadique en France. La floraison reste abondante mais les fleurs sont de mauvaise qualité et la mauvaise nouaison entraîne une chute importante des fruits.

Ces trois affections importantes du verger français sont dues à des phytoplasmes classés comme parasites de quarantaine se multipliant dans le phloème et le parenchyme adjacent. L’étude de ces micro-organismes, transmis par greffage ou par insectes vecteurs, en majorité non cultivables, nécessite des outils performants pour leur identification et leur détection.

La méthode présentée en annexe, repose sur l’emploi de la technique d’amplification par polymérisation en chaîne (PCR).

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 des phytoplasmes responsables de l'enroulement chlorotique de l'abricotier, de la prolifération du pommier et du dépérissement du poirier

Réf. : MOA 004 version a

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 18 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 004	**Consultation publique**		**Validité**	
Numéro de la version	**Début**	**Fin**	**Début**	**Fin**
VL/05/12/version a	Sans objet	Sans objet	Juin 2005	juin 2010
MOA 004 Version a	Avril 2010	Juin 2010	juin 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 12
   4.1. Tampons 12
   4.2. Autres réactifs et consommables 12
5. Appareillage et matériel 13
6. Contrôles et témoins 13
7. Prise d'essai 14
8. Etapes de l'analyse 14
   8.1. Broyage et extraction d'ADN total 14
   8.2. Test de détection par PCR conventionnelle 15
      8.2.1. Préparation et distribution du mélange réactionnel de PCR 15
      8.2.2. Amplification par PCR 15
   8.3. Digestion des amplifiats (RFLP) 16
      8.3.1. Mélange réactionnel pour la digestion enzymatique (Alu 1 et Rsa 1) ... 16
      8.3.2. Résultats de la digestion avec les enzymes Rsa 1 et Alu 1 17
9. Résultats 17
   9.1. Validation de l'analyse 17
   9.2. Interprétation et formulation des résultats 17

9.2.1. Surveillance du territoire 18
9.2.2. Importation 18
10. Élimination des matériels susceptibles d'être contaminants 18
11. Conservation des reliquats de matériels utilisés 18

LISTE DES DOCUMENTS OFFICIELS APPELES PAR LA METHODE 19

BIBLIOGRAPHIE SUCCINCTE 20

ANNEXE I - Répartition des différents groupes de phytoplasmes des arbres fruitiers 21

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 ou unités dérivées. 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

Une consultation publique est organisée en tant que de besoin avant la publication des méthodes officielles. Le document de travail est mis à disposition sur le site du ministère en charge de l'agriculture pendant une période de deux mois, au cours de laquelle les visiteurs sont invités à faire connaître leurs remarques, commentaires et suggestion et à signaler toute erreur, omission ou imprécision.

Les méthodes officielles sont par ailleurs 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 virologie des plantes, Bordeaux) visant à mettre au point une technique moléculaire de détection de l'enroulement chlorotique de l'abricotier, de la prolifération du pommier et du dépérissement du poirier sur rameaux et racines.

La présente méthode a été mise au point, optimisée et évaluée par la station de virologie des plantes, Bordeaux du LNPV.
Le travail de relecture et de revue documentaire a été effectué par le pôle développement de méthodes du LNPV.

PRINCIPALES MODIFICATIONS PAR RAPPORT A LA VERSION PRECEDENTE

Une modification concerne des parties-clé ou le fond même de la méthode officielle, dont la prise en compte est susceptible d'améliorer significativement la portée ou le résultat de la méthode d'analyse. Sa prise en compte peut nécessiter des adaptations importantes, c'est pourquoi un délai est en règle générale accordé pour que les laboratoires de référence, agréés ou officiellement reconnus l'intègrent dans leur processus d'analyses. Dans certains cas, clairement précisés, une modification peut nécessiter une prise en compte immédiate par les laboratoires. En cas de modification majeure, le numéro de version est incrémenté d'une unité (exemple: le version v1c devient v2a). La méthode ainsi modifiée est considérée comme une nouvelle méthode.

Une amélioration est une modification mineure, qui apporte des précisions utiles ou pratiques, reformule les propos pour les rendre plus clairs ou plus précis, rectifie des erreurs bénignes. En cas d'amélioration, le numéro de version reste le même mais la lettre associée est incrémentée (exemple: la version v1c devient v1d). La méthode ainsi améliorée n'est pas considérée comme une nouvelle méthode.

MODIFICATIONS

La présente version ne comporte aucune modification.

AMELIORATIONS

- Mise en forme de la méthode et modification du préambule selon un schéma harmonisé commun à l'ensemble des nouvelles méthodes.

- Retrait des définitions de ce document pour les intégrer dans un glossaire général.

DESCRIPTION DE LA METHODE

Détection des phytoplasmes de l'enroulement chlorotique de l'abricotier, de la prolifération du pommier et du dépérissement du poirier sur rameaux et racines, par la technique d'amplification génique PCR (Polymerase Chain Reaction). Espèces ligneuses des genres *Prunus*, *Malus et Pyrus*

1. Objet.

Conformément aux dispositions européennes dans le cadre de la Protection des Végétaux, les phytoplasmes du groupe 16Sr X*, responsable la prolifération du Pommier (Apple proliferation phytoplasma), l'enroulement Chlorotique de l'Abricotier (European Stone fruit yellows ; Apricot chlorotic leafroll phytoplasma ; Peach chlorotic leafroll phytoplasma) et le dépérissement du poirier (Pear decline phytoplasma) sont des organismes nuisibles de quarantaine sur fruitiers (*Prunus*, *Malus* et *Pyrus*).

A ce titre, ils font l'objet de contrôles à l'intérieur des territoires français et communautaire (surveillance du matériel de multiplication) et à l'importation.

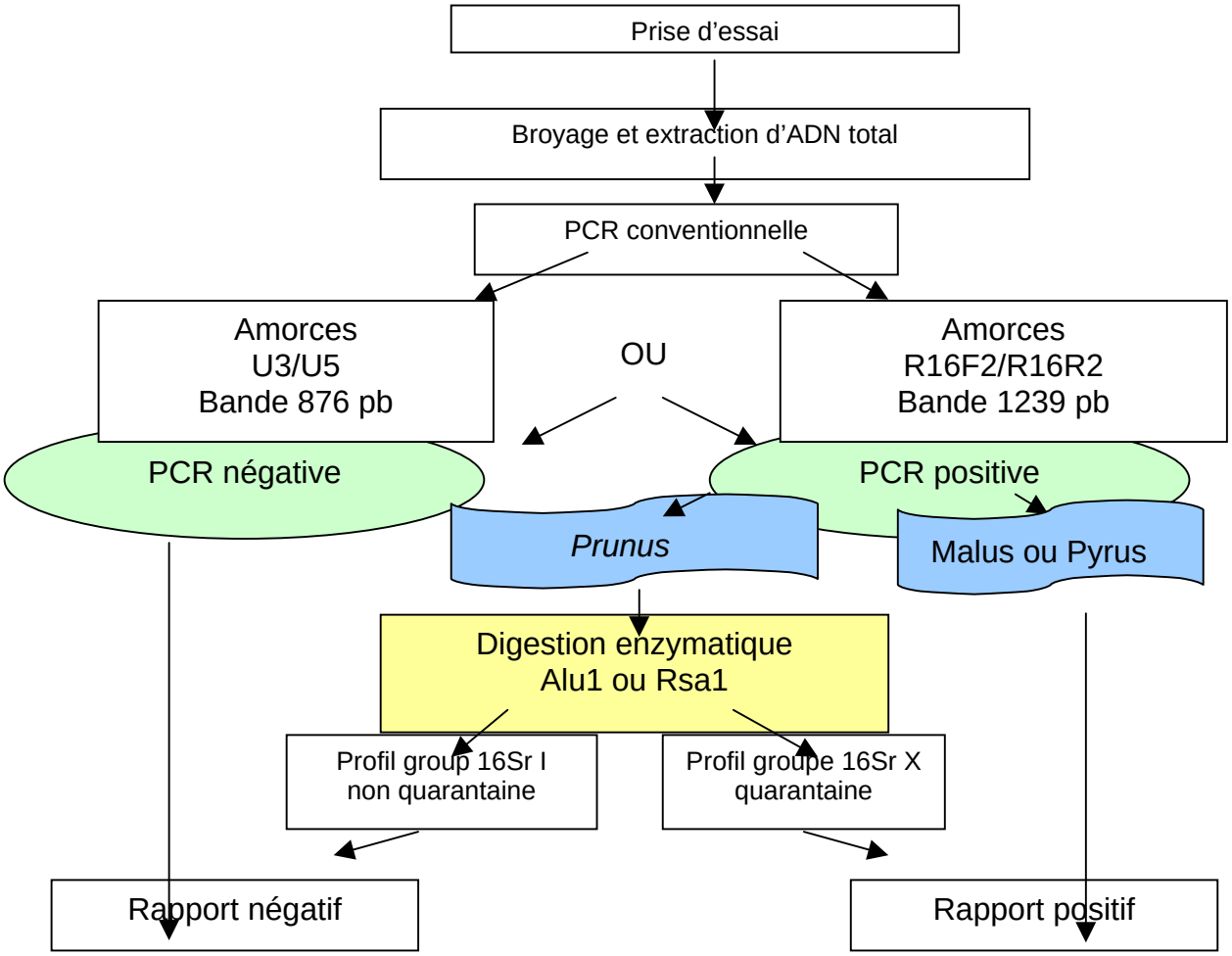
Cette méthode permet la mise en évidence de la présence de ces phytoplasmes dans un échantillon végétal donné.

*groupe 16 Sr X selon la classification de Lee *et al.* 1998a ; Davis and Dally 2001 ; Montano *et al.,*2001.

2. Domaine d'application.

La méthode s'applique à du phloème prélevé sous l'écorce des organes végétaux des arbres présentant ou non des symptômes (rameaux, racines).

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, ainsi que la conservation en cours d'utilisation, seront suivies. A défaut le laboratoire définira les conditions qu'il jugera optimales.
Certains produits utilisés dans cette méthode peuvent présenter un risque pour le manipulateur et ou l'environnement, suivre les recommandations du fournisseur pour l'utilisation de ces produits et l'élimination des déchets.

4.1. Tampons

Tampon de broyage
Solution chloroforme-alcool isoamylique
Solution d'éthanol 70%
Tampon d'électrophorèse TBE (Tris Borate EDTA) ou TAE (Tris Acetate EDTA)
Tampon de charge
Tampon de BSA (Bovine serum albumin)
Ce dernier sérum a une action contre des inhibiteurs de la polymérase , son utilisation est facultative.

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.

Oligonucléotides

Amorces U3 et U5 (détection des phytoplasmes tous groupes confondus)

Nom	Séquence	Longueur
U3 (Lorenz *et al*., 1995)	5' – TTC AGC TAC TCT TTG TAA CA – 3'	20 bases
U5 (Lorenz *et al*., 1995)	5' – CGG CAA TGG AGG AAA CT – 3'	17 bases

Taille du fragment amplifié : 876 paires de bases.

Amorces R16F2 et R16R2 (détection des phytoplasmes tous groupes confondus)

Nom	Séquence	Longueur
R16F2	5' – GAA ACG ACT GCT AAG ACT GG – 3'	20 bases
R16R2	5' – TGA CGG GCG GTG TGT ACA AAC CCC G- 3'	25 bases

Taille du fragment amplifié : 1 239 paires de bases

Ces amorces sont sensibles aux successions congélation-décongélation, il est recommandé de préparer des aliquots et de les garder au congélateur.

ADN polymérase
Les différentes formes commercialisées présentent des profils d'activité très différents, il est donc recommandé de s'assurer de leur efficacité ou de s'informer auprès du laboratoire de référence.

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

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.

Agarose
L'agarose utilisé doit être spécialement conçu pour la fabrication de gels d'électrophorèse. Les gels sont préparés

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
- Scalpel ou tout autre matériel permettant le grattage des échantillons.
- Sachets de broyage ou tout autre matériel dans lequel le broyage peut être réalisé.
- Contenants pour conservation des solutions préparées.
- Pipettes de précision pour volumes 0,5 à 1000 µL.
- Pointes à filtre adaptées aux micropipettes.
- Microtubes (si possible de 1,5 mL à fond conique et de 2 mL à fond rond).
- Microtubes ou plaques adaptés au thermocycleur du laboratoire.

5. Appareillage et matériel

En plus du matériel classique de laboratoire d'analyse, le matériel suivant est jugé nécessaire pour certaines phases de l'analyse:
- Sorbonne ou hotte chimique adaptées aux vapeurs de solvants ;
- Système de broyage des tissus végétaux ;
- Centrifugeuse (atteignant au moins 12 000 g) ;
- pHmètre ;
- Thermocycleur ;
- Générateur électrique pour électrophorèse ;
- Cuve à électrophorèse et accessoires ;
- Système de lecture de gel avec dispositif permettant la traçabilité des résultats.

6. Contrôles et témoins

Des échantillons de référence doivent être inclus en cours de processus analytique pour valider les différentes étapes de la méthode. Les contrôles à produire au cours de l'analyse sont a-minima les suivants :

- un contrôle positif de processus (E +) : tissu de végétal, traité dans les mêmes conditions que les échantillons à analyser déclaré contaminé à l'issue de la manipulation ;
- un contrôle négatif de processus (E -) : tissu de végétal, traité dans les mêmes conditions que les échantillons à analyser déclaré non contaminé à l'issue de la manipulation ;
- un contrôle positif d'amplification (A +) : solution d'acide nucléique cible donnant lieu à une bande d'amplification ;
- un contrôle négatif d'amplification (A -) solution ne contenant pas d'acide nucléique cible (Mix+eau) ne donnant pas lieu à une bande d'amplification ;

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

7. Prise d'essai

Un échantillon de laboratoire représente l'échantillon prélevé sur le terrain, suivant les recommandations de la personne responsable des analyses au laboratoire.
Les échantillons doivent arriver frais au laboratoire et sont stockés au frais après enregistrement.
Les échantillons sous forme de rameaux effeuillés peuvent être conservés, dans un sac en plastique hermétique avec un fond d'eau, plusieurs semaines au froid.

Les racines sont lavées à l'eau et débarrassées des racines secondaires.
Ecorcer l'échantillon à l'aide du scalpel et gratter afin d'obtenir des copeaux de phloème.
Récupérer 1 à 1,5 g de ces copeaux pour constituer l'échantillon d'analyse.
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

Il appartient au chargé d'analyse de veiller au repérage des échantillons au cours de toutes les étapes du mode opératoire

8.1. Broyage et extraction d'ADN total

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

1. Déposer 5 à 10 mL de tampon de broyage chaud pour 1 à 1,5 g d'échantillon. Broyer.Déposer 1 à 2 mL de broyat dans un microtube de 2 mL
2. Incuber les microtubes à 65° C pendant 30 minutes minimum. Centrifuger pour clarifier le broyat (2 000 g minimum, 2 à 5 minutes)
3. Reprendre (1 mL maxi) le surnageant dans un microtube de 2 mL
4. Sous hotte aspirante ajouter le chloroforme-alcool isoamylique 24 :1 volume pour volume. Mélanger par retournement manuel
5. Centrifuger 12 à 14 000 g , 5 minutes minimum, pour obtenir trois phases distinctes : une phase supérieure contenant les acides nucléiques, une interphase constituée des protéines et débris végétaux, et une phase chloroformique. Ne reprendre que du surnageant (phase supérieure) dans un microtube (à fond conique de 1,5 mL) en s'assurant de ne pas prélever des éléments de l'interphase.Veiller à récupérer la phase inférieure dans un conteneur spécifique pour l'élimination du solvant organique

Attention, le Chloroforme est un produit hautement toxique. Le travail s'effectue sous hotte aspirante uniquement et les déchets doivent être éliminés séparément.

6. Ajouter l'isopropanol froid (0,6 à 1 v/v de surnageant) Mélanger brièvement par retournement manuel, (*) puis centrifuger à 13 000 g minimum pendant 10 minutes minimum pour précipiter l'acide nucléique

(*)L'extraction peut être stoppée à cet instant. Il suffit de conserver les tubes remplis d'isopropanol au congélateur. Le temps de conservation de l'ADN sous cette forme peut être de plusieurs mois.

7. Eliminer le surnageant (aspiration par une pompe à vide ou à l'aide d'une micropipette ou retournement du tube sur papier filtre etc....)
8. Laver le culot avec l'éthanol à 70 %. Vortexer afin de décrocher le culot
9. Centrifuger de façon à bien recoller le culot au fond du tube pour faciliter l'élimination du surnageant (12 à 13 000g pendant environ 5 minutes donne satisfaction). Jeter le surnageant
10. Bien sécher le culot pour éviter toute trace d'alcool (étuve, SpeedVac ...)
11. Déposer 100 µL d'eau stérile distillée ou ultra-pure. Vortexer puis laisser solubiliser (la mise en congélation des tubes est recommandée)

Les extraits ainsi obtenus peuvent être conservés plusieurs jours au réfrigérateur à plusieurs mois au congélateur.

8.2. Test de détection par PCR conventionnelle

8.2.1. Préparation et distribution du mélange réactionnel de PCR

La composition du mélange réactionnel (volume réactionnel : 35 µL de Mix et 5µL d'extrait d'ADN) est la suivante :

Composé	Concentration finale
Eau Ultra Pure	qsp 35 µL
Tampon de polymérase à ADN fourni avec la polymérase à ADN	1 X
BSA	0,05% (50µg/mL)
Amorce 1	0,5 µM
Amorce 2	0,5 µM
dNTPs mix	250 µM
Polymérase à ADN (fournie à 5 U/µL)	1 U/µL
Ajouter 5 µl d'extrait d'ADN	

Un minimum de 2 puits par échantillon seront déposés.

8.2.2. Amplification par PCR

Les différents paramètres de la PCR conventionnelle pour la détection sont les suivants :

Cycle d'amplification (amorces U3/U5)

Etape		Température de consigne	Durée programmée	Nombre de cycles
1	Dénaturation initiale	94 °C	2 min	1
2	Dénaturation	94 °C	20 sec	**40**
	Hybridation	**55 °C**	20 sec	
	Polymérisation d'ADN	72 °C	1 min	
3	Elongation finale	72 ° C	4 min	1

Cycle d'amplification R16F2/R16R2

Etape		Température de consigne	Durée programmée	Nombre de cycles
1	Dénaturation initiale	94 °C	2 min	1
2	Dénaturation	94 °C	1 min	**35**
	Hybridation	**50°C**	2 min	
	Polymérisation d'ADN	72 °C	3 min	
3	Elongation finale	72 ° C	10 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 des risques de contaminations croisées (risques de faux positifs).
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.

8.3. Digestion des amplifiats (RFLP)

Cette étape permet la détermination du groupe du phytoplasme détecté sur les échantillons positifs par digestion enzymatique (enzymes de restriction Alu1 ou Rsa1). Attention : ne concerne que les *Prunus*.

Préparer le milieu réactionnel de la restriction conformément aux préconisations du fournisseur.

Déposer chaque amplifiat à digérer dans un contenant adapté (plaque ou tube PCR) et y ajouter la quantité de milieu réactionnel préconisée par le fournisseur.

Laisser incuber une nuit (ou 4 heures minimum) à 37°C +/- 3°C.

Préparer un gel à 2 ou 3% d'agarose permettant une bonne séparation des bandes.
Suivant le profil obtenu à l'issue de la digestion, le phytoplasme sera déclaré de quarantaine (groupe 16Sr X) ou non (groupe16Sr I) (cf. annexe I).

8.3.1. Mélange réactionnel pour la digestion enzymatique (Alu 1 et Rsa 1)

Produit	Concentration finale
Enzyme	2,5 U
Tampon enzyme	1 X
BSA	1X

La concentration initiale des produits (enzymes et BSA principalement) varie d'un fabricant à l'autre. Ne tenir compte que de la concentration finale et ajuster la quantité d'eau afin d'obtenir un volume final de 2 µL de préparation par échantillon.

La quantité réelle de BSA nécessaire par échantillon est trop infime pour pouvoir être prélevée correctement. Un excès n'étant pas préjudiciable, pour un petit nombre d'échantillons (inférieur à 10) prévoir le volume minimal de pipetage (environ 0,2 µL).

8.3.2. Résultats de la digestion avec les enzymes Rsa 1 et Alu 1

brins principaux obtenus (en pb)

Amorces U3/U5	**Groupe X**			**Groupe I**
	ESFY (ECA)	AP	PD	
Rsa 1	392 362 44	449 362 44	449 362 44	
Alu 1	476 189 149	476 189 149	476 189 149	352 274 191

Amorces R16R2/R16F2	**Groupe X**			**Groupe I**
	ESFY (ECA)	AP	PD	
Rsa 1	494 392 275 44	667 494 44	667 494 44	
Alu 1	476 229 189	476 229 189	476 229 189	411 352 191

ESFY (ECA) : european stone fruit yellows = Candidatus phytoplasma prunus
AP : Apple proliferation = Candidatus phytoplasma mali
PD : Pear decline = Candidatus phytoplasma pyri
Groupe 16Sr I : groupe des aster yellows
L'enzyme Alu1 permet de différencier le groupe 16Sr X (groupe de la prolifération du pommier) du groupe16Sr I (groupe des aster yellows) pouvant infecter les prunus.
L'enzyme Rsa 1 permet de différencier les phytoplasmes des Prunus (ESFY) de la prolifération du pommier, du dépérissement du poirier. Et vérifie la non appartenance au groupe16Sr I.

9. Résultats

9.1. Validation de l'analyse

L'analyse PCR est validée lorsque :
- la référence poids moléculaire est visible
- présence d'une bande d'amplification d'environ 880 pb (U3/U5) ou à environ 1200 pb (R16F2/R16/R2) au niveau des témoins positifs (extraction et PCR)
- absence d'amplification au niveau des témoins négatifs.

9.2. Interprétation et formulation des résultats

Un échantillon est déclaré infecté par du phytoplasme lorsqu'une bande d'amplification visible apparaît à la position attendue.

9.2.1. Surveillance du territoire

Pour les échantillons de ***Malus*** **ou** ***Pyrus***, la présence de phytoplasme est suffisante pour déclarer l'échantillon positif (tous les phytoplasmes sur ces espèces étant de quarantaine).

Pour les échantillons de ***Prunus***, la digestion enzymatique (Alu1 ou Rsa1) doit être réalisée pour différencier les phytoplasmes du groupe 16Sr X (de quarantaine) du groupe 16Sr I (groupe des aster yellows, non listés comme organismes de quarantaine sur *Prunus*).

9.2.2. Importation

Dans le cadre d'importation de pays tiers, tous les phytoplasmes non européens trouvés sur fruitiers sont déclarés de quarantaine. Dans ce cas, la digestion n'est pas obligatoire. La seule réponse positive à la PCR suffit.

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 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
DG 2/03 version a	Techniques qualitatives d'amplification enzymatique des acides nucléiques de type : PCR (*Polymerase Chain Reaction*), RT-PCR (*Reverse transcription* - PCR)
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
REP 001	Répertoire des recettes en vigueur au LNPV
GLO 001	Glossaire des termes techniques en vigueur au LNPV

BIBLIOGRAPHIE SUCCINCTE

Ahrens, U., and Seemüller, E. 1992. Detection of DNA of plant pathogenic mycoplasmalike organisms by a polymerase chain reaction that amplifies a sequence of the 16SrRNA gene. *Phytopathology* 82 :828-832.

Gunderson, D. E. and I. M. Lee. 1996. Ultrasensitive detection of phytoplasmas by nested-PCR assays using two universal primer pair. *Phytopath. Medit.* 35 : 144-151.

Levy, L., Lee, I. M., and Hadidi, A. 1994. Simple and rapid preparation of infected plant tissue extracts for PCR amplification of virus, viroïd and MLO nucleic acids. *J Virol. methods* 49 :295-304.

Lee, I-M., Hammond, R. W., Davis, R. E. and D. E. Gundersen. 1993b. Universal amplification and analysis of pathogen 16S rDNA for classification and identification of mycoplasmalike organisms. *Phytopathology* 83: 834-842.

Lorenz K.-H., Schneider B., Ahrens U., Seemüller E., 1995. Detection of the Apple Proliferation and Pear Decline Phytoplasmas by PCR amplification of ribosomal and nonribosomal DNA. *Phytopathology*, vol. 85, No. 7, 1995, pp 771-776.

Schneider, B., Seemüller, E., Smart, C. D. and Kirkpatrick, B. C. 1995. Phylogenetic classification of plant pathogenic mycoplasma-like organisms or phytoplasmas. *Molecular and Diagnostic Procedures in mycoplasmology.* Vol. 1. :369-380. Eds Academic Press, San Diego, CA.

ANNEXE I - REPARTITION DES DIFFERENTS GROUPES DE PHYTOPLASMES DES ARBRES FRUITIERS

Répartition mondiale des différents groupes de phytoplasmes des arbres fruitiers

Groupe Localisation	16Sr I	16Sr II *	16Sr III *	16Sr V *	16Sr IX *	16Sr X *
Amérique du Nord			Pêcher Poirier Prunus virginiana Cerisier			Poirier Pêcher
Australie		Poirier				
Chine				Cerisier		
Liban					Amandier	
Europe	Abricotier Pêcher Prunier japonais					Abricotier Pommier Poirier Pêcher Prunier Prunier japonais Amandier Prunier à fleurs

* : tous les phytoplasmes de ce groupe sont des organismes de quarantaine (Annexe I, partie A, chapitre 1e, pour les groupes 16Sr II, III, V et IX, chapitre II pour le groupe 16Sr X). Seuls les membres du groupe16Sr I (phytoplasmes seulement décrits en Europe) ne sont pas listés comme organismes de quarantaine.

Groupe des phytoplasmes sur fruitiers selon la classification de

- 16Sr I : Aster Yellows group
- 16Sr II : Faba bean phyllody group
- 16Sr III : X-disease group
- 16Sr V : Elm yellows group
- 16Sr IX : Pigeon pea witches' broom group
- 16Sr X : Apple proliferation group

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.