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/ 2010-04-018
MOD10.22 B 29/10/09

NOTE DE SERVICE

DGAL/SDQPV/N2010-8122

Date: 28/04/2010

Date de mise en application : Immédiate
Abroge et remplace : Sans objet

Nombre d'annexe : 1
Degré et période de confidentialité : Tout public

Objet : Méthode d'analyse MOA 005 partie A, pour la détection du Banana bract mosaic potyvirus (BBrMV) sur bananier par IC-RT-PCR conventionnelle.

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 du Banana bract mosaic potyvirus - BBrMV

Mots-clés : Virologie - méthode officielle – analyses - détection – Banana bract mosaïc potyvirus – BBrMV – bananier.

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

La présente note a pour objet la publication officielle de la méthode de détection du Banana bract mosaic potyvirus ou BBrMV responsable d'une maladie grave, la mosaïque des bractées du bananier.

Ce virus est un organisme nuisible réglementé par l'arrêté de lutte obligatoire du 31 juillet 2000 ; l'arrêté du 3 septembre 1990 interdisant son introduction dans les DOM et l'arrêté du 17 octobre 1995 relatifs aux conditions d'introduction des bananiers dans les DOM. Il est transmissible par puceron à des bananiers sains qui, par la suite, développent les symptômes typiques de la maladie.

La méthode MOA 005 partie A proposée à la publication permet de détecter spécifiquement le virus responsable de la mosaïque des bractées du bananier, elle est basée sur une technique mixte d'immunologie et d'amplification génique des séquences spécifiques du BBrMV (Iskra-Caruana et al., 2008).

Dans un premier temps, les particules virales sont capturées par des anticorps spécifiques (immunocapture) puis l'ARN viral est transcrit en ADN (Revers transcription). La détection de l'ADN transcrit est réalisée grâce à un test de polymérisation par amplification en chaîne (PCR). L'utilisation d'un couple d'amorces spécifique du parasite cible, permet de détecter et d'amplifier une portion discriminante de l'ARN de ce virus et de limiter les faux positifs.

Vous trouverez en annexe à cette note d'information la méthode officielle de détection du Banana bract mosaic potyvirus (BBrMV), MOA005 partie A.

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 du Banana bract mosaic potyvirus (BBrMV) sur bananier par IC-RT-PCR

Réf. : MOA 005 partie A version 1a

Droits de reproduction et Copyright

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

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

Dates de validité du présent document

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

Cependant, et sauf indication contraire explicite, la version précédente peut encore être utilisée pendant une durée maximale de 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 005	Consultation publique		Validité	
Numéro de la version	Début	Fin	Début	Fin
MOA 005 partie A version 1a	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 majeurEs **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.Choix des produits d'immunologie et de biologie moléculaire 11
4.2.Tampons 12
4.3.Autres consommables 12

5.Appareillage et matériel **12**
5.1.Prise d'analyse 12
5.2.Extraction de l'ADN 12
5.3.Électrophorèse 12
5.4.Révélation 13

6.Contrôles et témoins **13**

7.Immunocapture **13**

7.1.Coating 13
7.2.Préparation des échantillons 13
7.2.1.Prise d'analyse 13
7.2.2.Broyage 13
7.2.3.Clarification des extraits 14
7.3.Lavage 14
7.4.Dépôt des échantillons 14
7.5.Lavage 14

8.RT-PCR conventionnelle 14
8.1.Amplification 14
8.2.Réalisation du gel d'électrophorèse : 15

9.Résultats 15
9.1.Validation des résultats 15
9.2.Interprétation et formulation des résultats 16

10.Élimination des matériels susceptibles d'être contaminants 16

11.Conservation des reliquats de matériels utilisés 16

LISTE DES DOCUMENTS OFFICIELS APPELES PAR LA METHODE 17

BIBLIOGRAPHIE SUCCINCTE 18

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'agriculture, de l'alimentation 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

Le LNPV Station d'Angers remercie l'UMR-BGPI au CIRAD de Montpellier et le LDA 71 de Mâcon pour le développement des techniques et leurs participations lors de l'évaluation des méthodes.
Le laboratoire national de référence pour la détection du BBrMV est le laboratoire national de la protection des végétaux, station d'Angers (7 rue Jean Dixméras – 49044 ANGERS CEDEX 01).
Les travaux de méthodologie, de relecture et de révision ont été effectués par le pôle « Développement de méthodes » au sein du laboratoire national de la protection des végétaux, station d'Angers.

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

Sans objet (première version publiée).

AMELIORATIONS

Sans objet (première version publiée).

DESCRIPTION DE LA METHODE

Détection du Banana Bract Mosaïc potyvirus (BBrMV) par IC-RT-PCR conventionnelle

1. Objet.

La mosaïque des bractées du bananier est une maladie grave des bananiers dont l'agent causal est le Banana Bract Mosaïc potyvirus ou BBrMV.
La méthode décrite dans ce document permet, sur bananier, de détecter spécifiquement le virus responsable de la mosaïque des bractées du bananier (organisme nuisible de quarantaine, arrêté de lutte obligatoire du 31 juillet 2000).
La méthode est basée sur des techniques mixtes d'immunologie et d'amplification génique des séquences spécifiques du BBrMV (Iskra-Caruana *et al*., 2008).
Cette méthode est notamment utilisable dans le cadre des contrôles phytosanitaires réglementaires, à la production et à l'import-export.

2. Domaine d'application.

Objets susceptibles d'être soumis à analyse.

La méthode s'applique à des extraits végétaux, feuilles ou bractées, frais ou lyophilisés de bananier.

Limitations relatives aux objets susceptibles d'être soumis à analyse

Pour les échantillons frais, le matériel végétal doit arriver au laboratoire en bon état, propre, frais et non nécrosé. Dans le cas contraire, le laboratoire émet une réserve quant à un résultat d'analyse négatif en précisant l'état dégradé de l'échantillon à la réception au laboratoire.

Pour les échantillons lyophilisés, le demandeur d'analyse doit s'assurer que la lyophilisation est totale et que le conditionnement des échantillons n'entraîne pas une réhydratation de ces derniers jusqu'à l'analyse au laboratoire.

Grandeur de l'objet soumis à analyse.

Pour les échantillons frais, le laboratoire réalise l'analyse sur un minimum de 0,6 g et un maximum de 1,2 g de matériel végétal.
Pour les échantillons lyophilisés, le laboratoire réalise l'analyse sur un minimum de 0,3 g et un maximum de 0,5 g de matériel végétal.

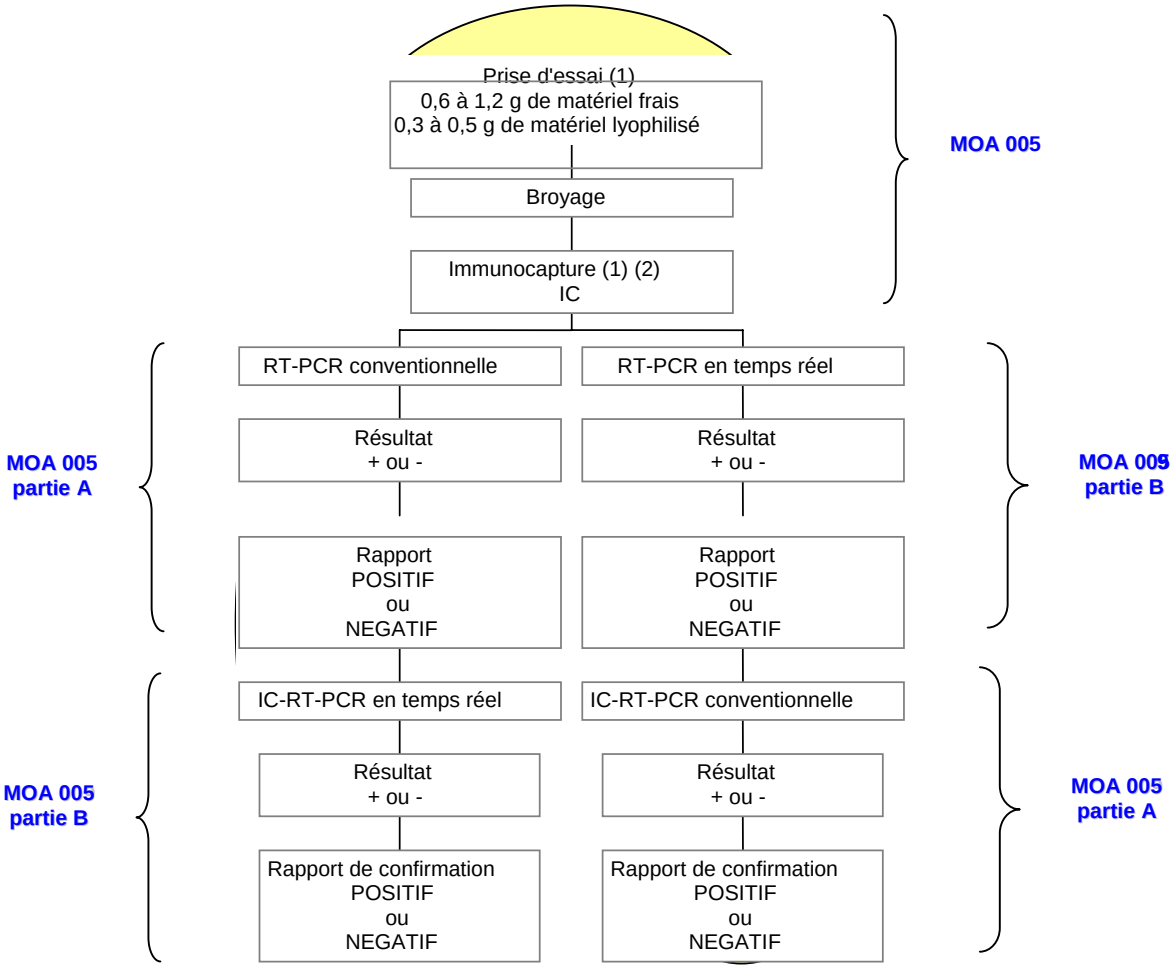
Pour des quantités de matériel végétal supérieures aux quantités décrites ci-dessus, le laboratoire sera amené à fractionner l'échantillon après accord préalable avec le demandeur d'analyse.

En deçà de ces quantités de matériel végétal, une réserve est émise quant au résultat d'analyse.

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 2 à 3 jours pour les échantillons frais prélevés dans de bonnes conditions, et de 3 à 4 semaines pour les échantillons lyophilisés à l'abri de la dessiccation. L'échantillon devra pendant ce temps être conservé au réfrigérateur.

3. Présentation schématique de la détection



(1) conserver le restant de matériel végétal et/ou de broyat. Sur demande de l'expéditeur, l'analyse peut être reprise soit à partir du reliquat de matériel végétal soit à partir de l'extrait végétal.
(2) veiller à utiliser les consommables adéquats selon la technique à mettre en œuvre.
De manière générale, une seule analyse permet de déterminer le statut de l'échantillon. Cependant, pour des raisons diverses, le demandeur d'analyse peut être amené à demander une confirmation du résultat d'analyse. Dans le cas de la détection du BBrMV, la méthode IC-RT-PCR conventionnelle peut permettre la confirmation d'un résultat d'IC-RT-PCr en temps réel et inversement.

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. Choix des produits d'immunologie et de biologie moléculaire

Certains composants sont d'une importance extrême et conditionnent les paramètres de l'amplification, ils doivent être identifiés précisément (sérum, amorces, sondes, reverse transcriptase et ADN polymérase). Un conseil pour le choix des fournisseurs peut être apporté par le laboratoire de référence. Il est recommandé de contacter celui-ci en cas de doute sur le réactif adéquat.

4.2. Tampons

Dans tous les cas, le laboratoire doit utiliser les tampons fournis conjointement au sérum et aux enzymes (reverse transcriptase et ADN polymérase) tel que recommandé par le fournisseur sauf spécification contraire dans la présente méthode.
Si le laboratoire utilisateur substitue l'un des réactifs proposé dans cette méthode, il doit au préalable estimer les conséquences de la substitution et tenir le dossier étayant cette substitution à la disposition des services du ministère et du laboratoire national de référence.

La liste des tampons nécessaire à la mise en œuvre de la méthode est la suivante :

- tampon de lavage PBS-T 1X ;
- tampon de broyage PBS-T-PVP (20%) ;
- tampon de coating ou tampon carbonate ;
- tampon de migration TBE 10X (par exemple) ;
- tampon de charge.

Leur composition est définie dans le répertoire des recettes REP-001.

Pour cette méthode les tampons nécessaires à la phase d'immunocapture (lavage, coating et broyage) doivent être autoclavés.

4.3. Autres consommables

Parmi les consommables spécifiques, il faut utiliser des consommables exempts de RNAse et DNAse et des cônes de prélèvement avec filtre.

Plusieurs types de consommables plastiques ont été utilisés lors de l'évaluation des méthodes. Ce point ne semble pas avoir d'impact sur le résultat de l'analyse. Si vous rencontrez des difficultés avec vos consommables courant de laboratoire, il est recommandé de contacter le laboratoire de référence.

5. Appareillage et matériel

En plus de l'appareillage courant d'un laboratoire de virologie décrit dans la Directive Générale DG 2 / 03, pour certaines phases de l'analyse, le matériel suivant est jugé nécessaire :

5.1. Prise d'analyse

- Balance de type II.

5.2. Extraction de l'ADN

- Sorbonne ou hotte chimique permettant la manipulation des produits volatils nocifs ou pulvérulents ;
- Verrerie pour les préparations et le stockage (flacons bouchonnés et éprouvettes) pouvant être autoclavée ;
- pH-mètre ;
- Eau de qualité analytique (équipement pour production d'eau ou achat de l'eau au titre des consommables) ;
- Broyeur de tissus végétaux et petit matériel adapté pour dilacérer les tissus végétaux, par exemple : broyeur à billes avec sachets de broyage, broyeur à rouleaux avec tubes (type hémolyse), presse à genouillère, ou ensemble équivalent permettant le broyage en présence de tampon ;

- Centrifugeuse pour clarification des extraits végétaux (environ 8 000 g) ;

5.3. Électrophorèse

- Équipement pour électrophorèse : Générateur et cuve(s) (à titre d'exemple : migration à 100 volts avec un front à 15 mm).

5.4. Révélation

Rappel : Pour des raisons de protection des manipulateurs, il est impératif de délimiter une zone et de dédier du matériel exclusivement réservé à l'utilisation des produits dangereux tel que le BET s'il est utilisé.

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 les suivants :

- un contrôle positif de processus (T +) : tissu de bananier, traité dans les mêmes conditions que les échantillons à analyser déclaré contaminé à l'issue de la manipulation ;
- un contrôle négatif de processus (T -) : tissu de bananier, traité dans les mêmes conditions que les échantillons à analyser déclaré non contaminé à l'issue de la manipulation ;
- un contrôle négatif de RT-PCR (A -) : un puit doit être réservé pour ne déposer que le mélange réactionnel de RT-PCR sans qu'il y ait eu le dépôt d'un échantillon. Ce contrôle atteste que le mélange réactionnel ne contient pas de contaminant.

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

7. Immunocapture

Cette étape est commune aux 2 techniques de RT-PCR proposées dans la présente méthode.

7.1. Coating

Déposer dans chaque puit, 30µL de sérum anti-BBrMV dilué au 1/200ème dans du tampon de coating. Fermer les puits.
Incuber dans une boîte hermétique « humide » pendant 4h à 37°C.

7.2. Préparation des échantillons

7.2.1. Prise d'analyse

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.
Le préparateur veillera à prélever les tissus les mieux conservés.

1) Tri des échantillons
Trier les échantillons par lot.
Opérer un regroupement par 5 échantillons maximum au sein d'un même lot.

2) Pesée des échantillons
Dans le cas d'échantillons lyophilisés :
Peser 0,1 g par échantillon (soit au maximum 0,5 g pour un mélange de 5).
Dans le cas d'échantillons frais :

Peser 0,24 g par échantillon (soit au maximum 1,2 g pour un mélange de 5).

7.2.2. Broyage

Le virus est thermosensible. Il est donc conseillé de déposer les sachets de broyage (et éventuellement les tubes pour les étapes suivantes) dans de la glace ou de disposer des pains de glace réfrigérés dans le portoir.
Ajouter le tampon de broyage pour obtenir une dilution au 1/10^{ième} de l'échantillon selon les recommandations suivantes :

Type d'échantillon	Nature d'échantillon	Poids du mélange	Volume de tampon à ajouter
Lyophilisé	Feuilles	0,5 g	12,5 mL
		0,4 g	10,00 mL
		0,3 g	7,5 mL
	Bractées	0,5 g	21 mL
		0,4 g	16,8 mL
		0,3 g	12,6 mL
Frais	Feuilles ou bractées	1,2 g	6 mL
		1,0 g	5 mL
		0,8 g	4 mL
		0,6 g	3mL

Broyer jusqu'à obtention d'un mélange homogène à l'aide d'un broyeur à bille.
Les échantillons sont prêts à être utilisés pour l'immunocapture.

7.2.3. Clarification des extraits

Transférer le broyat dans des tubes Eppendorf en laissant environ 1 cm de vide pour une éventuelle congélation.
Centrifuger à 8 000 g pendant 5 minutes à 4°C.
Remarque : si les broyats doivent être conservés, re-suspendre le matériel végétal avant congélation.

7.3. Lavage

A l'issu du coating, faire 4 rinçages de la plaque ou des barrettes avec 100 µL par puit de tampon de lavage.
Eliminer le liquide de lavage et sécher par retournement sur du papier absorbant.

7.4. Dépôt des échantillons

Pour chaque échantillon, un minimum de 2 dépôts doit être réalisés pour la recherche du BBrMV.
Déposer 25 µL de broyat par puit. Fermer les puits.
Incuber une nuit à 4°C dans une boîte hermétique « humide ».
Remarque : A partir de cette étape, porter des gants pour éviter la dégradation des ARN.

7.5. Lavage

Faire 4 rinçages avec 100 µL par puit de tampon de lavage pour éliminer les débris végétaux.
Faire 2 rinçages avec 100 µL d'eau RNase free pour éliminer les sels de tampon pouvant inhiber les enzymes .

8. RT-PCR conventionnelle

8.1. Amplification

Le BBrMV étant un virus à ARN, ce dernier doit au préalable être transcrit en ADNc pour être amplifié. L'amplification spécifique de l'ADNc du BBrMV est réalisée grâce au couple d'amorces suivant :

BRACT N2 : 5'- ACA TGG AGT ATG GAT AAGG -3'

BRACT NR : 5'- GTG TGC YTC TCT AGC CCT GTT -3'

La taille des amplifiats générés est de 260 pb.

Remarque : Pendant toute la préparation de la réaction, le port des gants est obligatoire et l'ensemble des réactifs doit être maintenu au froid (glace ou pain de glace) pour limiter la dégradation des ARN.

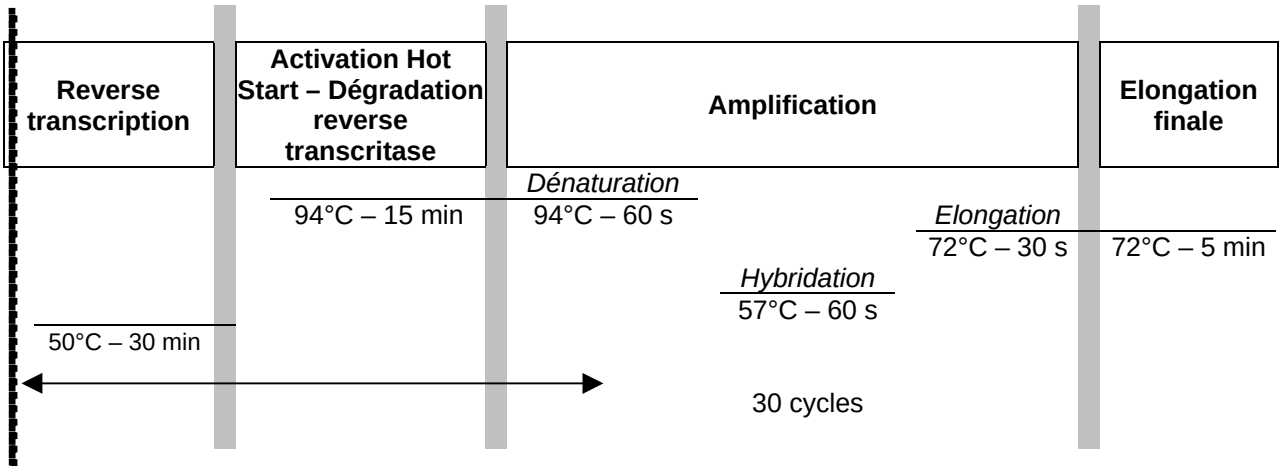
Constituer le mélange réactionnel suivant pour un volume total de 25 µL.

Réactifs	**Concentration finale**	A titre indicatif (pour un volume total de 25 µL par microtube)	
		Concentration initiale	Volume /microtube (en µL)
eau ultra pure			16,5
Tampon	**1X**	5X	5,0
dNTP	**0,2 mM**	10 mM	0,5
amorce Bract NR	**0,40 µM**	10 µM	1,0
amorce Bract N2	**0,40 µM**	10 µM	1,0
RT/Taq mix	**-**		1,0

Remarque : Ce mélange réactionnel a été éprouvé avec le kit Qiagen OneStep RT-PCR®

Déposer 25 µL par puit dans les tubes préparés à l'étape d'immunocapture.

Programmer le thermocycleur de la manière suivante :



8.2. Réalisation du gel d'électrophorèse :

Déposer 6 à 15 µL de l'amplifiat mélangé à du bleu de charge (environ 2µL pour 13µL d'amplifiat) sur un gel d'agarose à 3% (valeurs indicatives).
Faire migrer dans du TBE à concentration identique à celui utilisé pour réaliser le gel. (A titre indicatif, 100 volts durant 20 à 30 min.)
Une fois l'électrophorèse finie, colorer le gel dans un bain de BET et révéler sous UV. (le BET est très fréquemment utilisé comme marqueur à la concentration de 1 µg/mL). Cette solution doit être protégée de la lumière, après coloration, laver le gel à l'eau (sans chlore).

Remarques : Veiller à la protection des utilisateurs contre les U.V. (les yeux) et le BET, port des gants obligatoire. Tous les déchets ayant été en contact avec du BET doivent être éliminés selon une procédure adaptée à ces déchets toxiques.

9. Résultats

L'observation du gel sous U.V. ne constitue pas un moyen suffisant pour garantir la traçabilité des résultats. Un équipement adapté fournissant une « copie / image » fidèle du gel sur un support stable (papier, …) référencé est nécessaire.

9.1. Validation des résultats

L'analyse est validée si les conditions ci-dessous sont vérifiées.

Type de contrôle	**Résultat attendu**
Contrôle négatif de processus (T -)	**NEGATIF**
Contrôle négatif de RT-PCR (A -)	**NEGATIF**
Contrôle positif de processus (T +)	**POSITIF**

9.2. Interprétation et formulation des résultats

L'analyse est qualitative. Le test est négatif pour les échantillons ne présentant aucune bande à la taille attendue. Le test est positif pour les échantillons présentant une bande à la taille attendue.

Les résultats s'interprètent de la manière suivante :

Analyse		**Résultat**	**Formulation**
Puit 1	**Puit 2**		
+	**+**	**POSITIF**	Résultat positif pour la détection du BBrMV
+	**-**	**PCR à refaire**. Si au moins 1 positif sur 2, le résultat est interprété comme positif.	
-	**-**	**NEGATIF**	Résultat négatif pour la détection du BBrMV

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 virus sont des parasites stricts, les structures cellulaires hôtes sont indispensables à leur survie. Il est donc suffisant de détruire ou de déstructurer les tissus végétaux constituant l'échantillon pour éviter leur maintien et éventuellement leur dissémination.
Par ailleurs les insectes vecteurs peuvent constituer une source de dissémination. Le laboratoire doit mettre en œuvre des mesures prenant en compte ces risques.

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
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
Arrêté du 3 septembre 1990, complété par celui du 3 décembre 1991 (annexes DOM)	précise l'inscription en annexe II (organisme dont l'introduction est interdite s'il se présente sur certains végétaux ou produits végétaux) du BBrMV pour la Guadeloupe, la Guyane, la Martinique et la Réunion sur bananier.
Arrêté du 17 octobre 1995	relatif aux conditions d'entrée par dérogation de matériel végétal de bananiers dans les DOM
Arrêté du 31 juillet 2000	établissant la liste des organismes nuisibles aux végétaux soumis à des mesures de lutte obligatoire
Rapport d'évaluation MOA 009 (2009)	Évaluation des différentes techniques de détection du Banana Bract Mosaïc Virus (BBrMV) sur bananier.
REP 001	Répertoire des recettes en vigueur au LNPV
GLO 001	Glossaire des termes techniques en vigueur au LNPV

BIBLIOGRAPHIE SUCCINCTE

Iskra-Caruana M.-L., Galzy S., Laboureau N., 2008. A reliable IC One-step RT-PCR method for the detection of BBrMV to ensure safe exchange of Musa gerplasm. *Journal of virological methods* vol. 153, Issue 2, pp 223-231.

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.