Liberté • Égalité • Fraternité
RÉPUBLIQUE FRANÇAISE

MINISTERE DE L'AGRICULTURE, DE L'ALIMENTATION, DE LA PÊCHE,
DE LA RURALITE ET DE L'AMENAGEMENT DU TERRITOIRE

Direction générale de l'alimentation
Service de la prévention des risques sanitaires de la production primaire
Sous-direction de 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/2011-04-007
MOD10.21 E 01/01/11

NOTE DE SERVICE

DGAL/SDQPV/N2011-8085

Date: 06/04/2011

Date de mise en application :	Immédiate
Abroge et remplace :	Les méthodes précédentes MF/07/22 et MF07/23
Date d'expiration :	Sans objet
Date limite de réponse/réalisation :	Sans objet
Nombre d'annexes :	2
Degré et période de confidentialité :	Aucune

Objet : Méthode officielle d'analyse MOA 018 partie A version 1a et partie B version 1a relative à la détection de *Phytophthora ramorum* sur feuilles, rameaux, bourgeons et troncs

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, 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 d'analyse MOA 018 partie A version 1a et partie B version 1a relative à la détection de *Phytophthora ramorum* sur feuilles, rameaux, bourgeons et troncs.

Mots-clés : Mycologie - méthode officielle – analyses - détection – *Phytophthora ramorum* – feuilles - rameaux – bourgeons - troncs

Destinataires
Pour information : - DRAAF-SRAL - DAAF-Service de l'alimentation - Anses - Laboratoire de la Santé des Végétaux - Laboratoires agréés

Conformément à la décision de la Commission 2002/757/CE du 19 septembre 2002, modifiée par la décision 2007/201/CE du 27 mars 2007, relative aux mesures d'urgence phytosanitaires provisoires pour prévenir l'introduction et la dissémination de *Phytophthora ramorum* au sein de l'Union européenne, ce champignon est considéré comme un organisme réglementé.

La présente note a pour objet la publication de la méthode officielle de la méthode de détection de *Phytophthora ramorum* Werres, De Cock & Man in't Velt, agent de la mort brutale du chêne (sudden oak death). Celle-ci est composée de deux parties données en annexe :

- La partie A de la méthode présentée en annexe de cette note permet de détecter la présence de *P. ramorum* dans un échantillon prélevé sur plante hôte lorsque celui-ci est présent sous une forme biologiquement active (non quiescente ou morte). Sa présence est mise en évidence par isolement sur un milieu sélectif puis identification morphologique.
Cette méthode-partie A est qualitative, elle permet de détecter *P. ramorum* mais pas de le quantifier dans l'échantillon analysé.

- La partie B de la méthode présentée en annexe de cette note permet de détecter la présence de *P. ramorum* dans un échantillon prélevé sur plante hôte ou de confirmer l'identité d'un oomycète isolé en culture pure. La présence de *P . ramorum* est mise en évidence par deux tests PCR (Polymerase Chain Reaction) consécutifs qui ciblent des loci différents et indépendants dans le génome de l'oomycète.
Cette méthode-partie B est qualitative, elle permet de détecter *P. ramorum* dans la limite du seuil de détection de la technique employée mais pas de le quantifier dans l'échantillon analysé.

Les deux techniques sont globalement similaires. Toute détection de *Phytophthora ramorum* sur tissus végétaux peut-être indifféremment réalisée avec la partie A ou avec la partie B de la présente méthode.

Néanmoins, la technique PCR est légèrement plus sensible. Elle sera donc mise en œuvre préférentiellement pour les analyses officielles à l'importation, à l'exportation de végétaux ou pour les analyses de confirmation éventuelles.
La méthode par isolement présente quant à elle un coût plus faible et peut être mise en œuvre utilement pour de faibles nombres d'échantillons. Elle pourra être choisie en surveillance du territoire.

L'ingénieur en Chef des ponts, des eaux et des forêts
Sous-directeur de la qualité et de la protection des végétaux

Robert TESSIER

METHODE OFFICIELLE D'ANALYSE

Détection de *Phytophthora ramorum* sur feuilles, rameaux, bourgeons et troncs par isolement

Réf. : MOA 018 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 de la méthode.

n° méthode	Consultation publique		Validité	
Numéro de la version	Début	Fin	Début	Fin
MF/07/22 version a	-		2007	Avril 2011
MOA 018 version1a	Janvier 2011	Février 2011	Avril 2011	

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
5. Appareillage et matériel 12
6. Contrôles et témoins 12
7. Prise d'essai 13
8. Etapes de l'analyse 14
9. Expression et formulation des résultats 15
10. Élimination des matériels susceptibles d'être contaminants 15
11. Conservation des reliquats de matériels utilisés 15
LISTE DES DOCUMENTS OFFICIELS APPELES PAR LA METHODE 16
BIBLIOGRAPHIE SUCCINCTE 17

ANNEXE 1 :.....18

Composition des différents milieux de culture 18

ANNEXE 2 : Glossaire.....19

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.

ÉCHANTILLONNAGE 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 (ou critique) est un réactif directement impliqué dans la reconnaissance des organismes recherchés ou dont la qualité peut affecter directement le résultat.

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.

Toute 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'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

La présente méthode a été adaptée par l'Unité de Mycologie du Laboratoire de la Santé des Végétaux. Elle s'appuie sur les pratiques courantes d'isolement et d'identification morphologiques des *Phytophthora* spp., sur les premières publications parues sur *Phytophthora ramorum* (Werres *et al.* notamment) ainsi que sur le protocole de diagnostic OEPP.

Le travail de relecture et de révision a été effectué par l'unité « Développement de méthodes et analyses » du même laboratoire.

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

AMELIORATIONS

Changement de format dans l'écriture de la méthode, selon un nouveau standard.

DESCRIPTION DE LA METHODE

1.Objet.

Conformément à la décision de la Commission 2002/757/CE du 19 septembre 2002, modifiée par la décision 2007/201/CE du 27 mars 2007, relative aux mesures d'urgence phytosanitaires provisoires pour prévenir l'introduction et la dissémination au sein de l'Union européenne de *Phytophthora ramorum*, ce champignon est considéré comme un organisme réglementé.

Phytophthora ramorum est un oomycète agent de la mort brutale du chêne (sudden oak death).
L'objet de cette méthode est de détecter la présence de *P. ramorum* dans un échantillon prélevé sur plante hôte. Sa présence est mise en évidence par isolement sur un milieu sélectif puis identification morphologique.

Cette méthode est qualitative, elle permet de détecter *P. ramorum* mais pas de le quantifier dans l'échantillon analysé.
Les échantillons pour lesquels une réponse négative est obtenue sont considérés comme indemnes de *P. ramorum* ou contaminé à un niveau trop faible ou contaminés par une forme non cultivable (quiescente, morte) pour être mis en évidence par la technique utilisée.

2. Domaine d'application.

Objets susceptibles d'être soumis à analyse.

La méthode permet de détecter *Phytophthora ramorum* sur les feuilles, rameaux, bourgeons et troncs de diverses espèces végétales[1].

Limitations relatives aux objets susceptibles d'être soumis à analyse

Les échantillons doivent arriver au laboratoire en bon état, (propres, frais…). Dans le cas contraire, le laboratoire émet une réserve sur tout résultat d'analyse négatif en précisant l'état dégradé de l'échantillon à la réception au laboratoire.

Grandeur de l'objet soumis à analyse.

La méthode s'applique sur tissus végétatifs de toute taille présentant des symptômes (nécroses, colorations, suintements…).

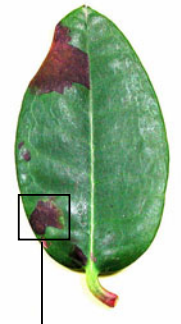
Précaution(s) particulière(s) à prendre.
Le délai maximal entre la réception de l'échantillon et le début effectif de l'analyse doit être inférieur à 8 jours pour des échantillons végétaux prélevé dans de bonnes conditions. L'échantillon devra pendant ce temps être conservé à 5±3°C.

Phytophthora ramorum a un statut de parasite réglementé, c'est à dire qu'il doit être manipulé dans de strictes conditions de quarantaine en accord avec la directive 2008/61/CE. Bien qu'il ne figure pas sur les listes de la directive 2000/29/CE, l'exigence pour la manipulation et le confinement de cet agent pathogène à dissémination aérienne doit être de type NS3.

[1] Une liste officielle d'espèces végétales sensibles à *Phytophthora ramorum* a été établie par la Commission européenne (Décision communautaire 2002/757/CE du 19 septembre 2002, modifiée par la Décision 2007/201/CE du 27 mars 2007). Une liste nationale de végétaux à surveiller en priorité est régulièrement publiée par le biais d'une Note de service (DGAL-SDQPV). Ces listes sont très évolutives et non exhaustives, les espèces végétales susceptibles d'être analysées sont donc nombreuses et variées (arbres, arbustes, feuillus, conifères…).

3.Présentation schématique de la détection

Echantillon de tissu végétal reçu au laboratoire



Collecte de tissus symptomatiques:
échantillon pour analyse



Isolement mycologique sur milieu sélectif,
Repiquages éventuels



Montage entre lame et lamelle
et observation microscopique

Présence ou absence de *Phytophthora ramorum*

4. Produits et consommables

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

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

Consommables entrant dans la composition des milieux de culture
- Milieu Phytophthora : cf. **annexe 1**
- Milieu V8 agar : cf. **annexe 1**
- Milieu Corn Meal Agar : cf. **annexe 1**

Eau de Javel ou solution d'hypochlorite de sodium (NaOCl) à 1°Chlorométrique minimum.

Ethanol à 70°

Solution bleu coton ou acide fuchsine
Ces colorants dilués dans de l'acide lactique sont utilisés pour l'observation microscopique des structures fongiques. L'acide lactique est également utilisable seul pour le même usage.

Consommables plastiques
- Boîtes de Pétri stériles

Autres consommables
- Manches et lames de scalpel
- Lames porte-objets pour microscopie
- Lamelles couvre-objets pour microscopie
- Coton, papier absorbant
- Film plastique de type Parafilm.
- Alcool à brûler

5.Appareillage et matériel

En plus de l'appareillage courant d'un laboratoire de microbiologie, le matériel suivant est jugé nécessaire pour certaines phases de l'analyse :
- Poste de Sécurité Microbiologique de classe II équipé d'une source de flamme pour la stérilisation des instruments
- Enceinte climatique thermostatée ou pièce à température contrôlée à ± 3°C
- Microscope optique équipé au minimum des objectifs X10, X20 et X40
- Loupe binoculaire (stéréomicroscope), grossissement minimum X10
- Appareil pour la stérilisation en chaleur humide (autoclave pouvant atteindre une température minimale de 121°C pendant 20 mn) ou tout autre appareil permettant d'obtenir le même résultat.
- Sécateur

6.Contrôles et témoins

Témoin positif : lames microscopiques de référence, serties au vernis, qui présentent du mycélium, et/ou des sporanges et/ou des chlamydospores de *Phytophthora ramorum*.

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 : bien séparer les échantillons, désinfecter mains et matériel à l'éthanol à 70° après chaque manipulation.

Si l'échantillon est sale (terre, mousse…), le nettoyer par rinçage ou éventuellement brossage dans de l'eau, en prenant soin de ne pas endommager les parties intéressantes. Laisser sécher ensuite à l'air libre sur du papier absorbant.

La prise d'essai s'effectuer uniquement sur des tissus présentant des symptômes typiques d'une infection par *Phytophthora ramorum* ou des symptômes douteux.

•Symptômes (voir illustrations en **annexe 3**) : chancre, coloration ou nécrose sur tronc, rameau, bourgeon ou feuille.

Tableau 1 : symptomatologie sur les principales espèces végétales contaminées en Europe
NB : les hôtes principaux figurent en caractères gras

***Rhododendron* spp.**	**Taches/nécroses brunes à noires sur feuilles, rameaux, extrémités de pousses, bourgeons et boutons floraux. Chancres sur rameaux pouvant entraîner leur flétrissement**
***Viburnum* spp.**	**Taches/nécroses sur rameaux entraînant leur flétrissement puis leur mort. Taches brunes à noires sur feuilles (surtout sur les espèces à feuilles persistantes). Des symptômes sur fleurs sont également possibles**
***Camellia* spp.**	**Taches/nécroses sur feuilles et pousses**
Pieris spp.	Taches/nécroses foliaires, lésions sur tiges et rameaux conduisant à des flétrissements
Kalmia latifolia	Taches/nécroses foliaires
Arbutus unedo	Taches/nécroses foliaires
Leucothoe fontanesiana	Taches/nécroses foliaires
Vaccinium vitis-idaea	Taches/nécroses foliaires, lésions sur tiges et rameaux conduisant à des flétrissements
Syringa vulgaris	Taches/nécroses foliaires
Hamamelis virginiana	Taches/nécroses sur feuilles (ces nécroses sont souvent délimitées par les nervures), rameaux, extrémités de pousses, bourgeons et boutons floraux.
Taxus baccata	Nécroses de jeunes aiguilles et de pousses
Aesculus hippocastanum	Chancres pouvant être suintants
Castanea sativa	Taches/nécroses foliaires, chancres pouvant être suintants*
Fagus sylvatica	Chancres pouvant être suintants
Quercus cerris	Chancres pouvant être suintants
Quercus falcata	Chancres pouvant être suintants
Quercus ilex	Taches/nécroses sur feuilles et rameaux, flétrissements de pousses
Quercus rubra	Chancres pouvant être suintants

*Sur châtaignier, seuls des symptômes foliaires ont été observés en Europe. L'état des troncs et branches est néanmoins à surveiller.

L'échantillon sera découpé afin de ne conserver que les parties présentant les symptômes les plus typiques.

8. Etapes de l'analyse

L'ensemble des opérations décrites (sauf incubation et lecture) doit s'effectuer en conditions stériles.

8.1. Isolement

La prise d'essai est désinfectée par passage sur sa surface d'un coton imbibé d'éthanol à 70°. Sur les parties ligneuses, l'excès d'alcool peut-être éliminé par un passage rapide à la flamme. Il faut éviter de trop imbiber l'échantillon d'alcool afin de ne pas endommager la partie active de la lésion (limite de nécrose).
Avec un scalpel stérilisé (trempé dans l'alcool à brûler puis passé à la flamme et refroidi) prélever des petits fragments (2 mm^2 environ) de tissu en limite de la zone nécrotique ou colorée. Sur parties ligneuses, ces fragments peuvent être prélevés après avoir enlevé au scalpel la couche superficielle de l'écorce.
Déposer les fragments directement sur milieu *Phytophthora* à raison d'environ 8 implants par boîte. Il est souhaitable d'avoir au moins 3 boîtes par échantillon, avec si possible des isolements sur symptômes variés (taches foliaires, nécroses de bourgeons…). Stériliser le scalpel entre chaque prélèvement.
Les boîtes d'isolement sont ensuite incubées à 22±3°C.

8.2. Lecture des boîtes d'isolement et repiquage

Au bout d'environ 4 à 6 jours jours d'incubation, faire une première observation au microscope à travers le fond de la boîte (grossissement X 100), puis régulièrement (deux fois par semaine environ).

Pour des observations plus précises (pour effectuer des mesures par exemple), prélever à l'aide d'une aiguille désinfectée (trempée dans l'alcool à brûler puis passée à la flamme et refroidie) du mycélium et le monter dans de l'acide lactique ou une solution de bleu de méthyle ou de fuchsine, entre lame et lamelle.

Repiquages éventuels : si plusieurs types de mycélium apparaissent dans la même boîte, effectuer sans attendre le repiquage de ceux dont l'aspect peut faire penser à *P. ramorum* (voir paragraphe suivant) sur milieux CMA et V8, afin d'éviter des mélanges. Effectuer également des repiquages en cas de doute sur l'identification de l'organisme.

8.3. Identification

Colonie	Sur milieux Phytophthora et CMA : mycélium blanc non aérien, peu dense, à croissance lente (environ 2 mm par jour), bord de la colonie irrégulier Sur milieu V8 -agar: croissance moyenne (3 mm par jour voire plus), mycélium assez dense et aérien, aspect homogène avec parfois de légers cercles concentriques ou des rosettes peu marquées
Mycélium	Coralloïde sur milieux Phytophthora et CMA, moins caractéristique sur V8-agar. Pas de swellings.
Chlamydospores	Produites après 7 à 10 jours de culture, souvent dans les parties anciennes du mycélium. Diamètre important: jusqu'à 80 µm , hyalines à brun foncé. La rapidité d'apparition ainsi que la quantité de chlamydospores peuvent varier d'un isolat à l'autre. Une incubation des cultures 3 jours à l'obscurité peut favoriser leur production
Sporanges	Produits en abondance à la surface du mycélium, particulièrement sur V8-agar, semi-papillés, caduques, à pédicelles courts (moins de 5 µm) ou absents. Taille : 40-80 µm x 20-32µm (moyenne 52 µm x 25 µm). Ratio longueur/largeur souvent supérieur à 2. Ellipsoïdes, ovoïdes allongés, fusoïdes. Souvent en petits groupes.
Organes sexuels	Non observables en culture simple (espèce hétérothallique). Oogones, anthéridies et oospores peuvent être obtenus par appariement avec le type sexuel opposé, de *Phytophthora cryptogea* par exemple (Werres et Zielke, 2003)

Tableau 1 : caractéristiques culturales de *Phytophthora ramorum*. Illustrations en **Annexe 4**

Pour être identifié en tant que *Phytophthora ramorum*, un isolat doit présenter **l'ensemble des caractéristiques suivantes** :

- Sur milieu Phytophthora ou CMA : mycélium blanc à croissance lente, légèrement à fortement coralloïde.
- Présence de chlamydospores de grandes tailles (plus de 40 µm de diamètre et jusqu'à 80 µm) hyalines à brun foncé
- Présence de sporanges allongés (40-80µm x 20-32 µm) ellipsoïdes, ovoïdes ou fusoïdes, semi-papillés, caduques à pédicelles courts ou absents.
- Pas d'organes sexuels (oogones, anthéridies, oospores) en culture simple.

Si après 10 jours aucun mycélium susceptible d'être *Phytophthora ramorum* n'a été observé dans les boîtes d'isolement, abandonner les recherches. Ce délai peut être porté jusqu'à trois semaines en cas de repiquage(s).

9. Expression et formulation des résultats

- Si pour une prise d'essai au moins un des isolats obtenus présente toutes les caractéristiques de *P. ramorum*, l'échantillon analysé est dit positif pour *Phytophthora ramorum*, suivant la méthode ci-décrite.

- Si pour une prise d'essai aucun des isolats obtenus ne présente toutes les caractéristiques de *P. ramorum*, l'échantillon est dit négatif pour *Phytophthora ramorum*, suivant la méthode ci-décrite.

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.

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
Méthode MF/07/22a	Détection *de Phytophthora ramorum* sur feuilles, rameaux, bourgeons et troncs par isolement
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
Dossier d'évaluation	Comparaison avec la méthode MF/07/23a
REP 001	Répertoire des recettes en vigueur au LNPV
GLO 001	Glossaire des termes techniques en vigueur au LNPV

BIBLIOGRAPHIE SUCCINCTE

DELATOUR, C. ; SAURAT, C. ; HUSSON, C. ; IOOS, R. ; SCHENCK, N. ; ROSE, S., 2002 : Discovery of ***Phytophthora ramorum*** in France on *Rhododendron* and experimental symptoms on *Quercus robur. Sudden Oak Death Symposium, Monterey, California*, 15-18 décembre 2002 (poster).

EPPO/OEPP, 2004 : Diagnostic protocols for regulated pests/ Protocoles de diagnostic pour les organismes réglementés : ***Phytophthora ramorum***. (brouillon novembre 2004).

RIZZO, D.M. ; GARBELOTTO, M. ; DAVIDSON, J.M. ; SLAUGHTE, G.W. ; KOIKE S.T., 2002 : ***Phytophthora ramorum*** as the cause of extensive mortality of *Quercus* spp. and *Lithocarpus densiflorus* in California. *Plant Disease* **86**, 205-214.

WERRES, S. ; MARWITZ, R. ; MAN IN 'T VELD, W.A. ; DE COCK, A.W.A.M. ; BONANTS P.J.M. ; DE WEERDT M. ; THEMAN K. ; ILIEVA E. ; BAAYEN R.P., 2001 : ***Phytophthora ramorum*** sp. nov., a new pathogen on *Rhododendron* and *Viburnum*. *Mycological Research* **105**, 1155-1165.

WERRES, S. ; ZIEHLKE, B., 2003 : First studies on the pairing of ***Phytophthora ramorum***. *Journal of Plant Disease and Protection* **110**, 129-130.

ANNEXE 1 :

Composition des différents milieux de culture

Avant utilisation, ces milieux peuvent être stockés jusqu'à une semaine à température ambiante et à l'abri de la lumière directe ou jusqu'à 3 mois à 5±3°C à l'abri de la lumière directe.

Milieu Phyto (Phytophthora)

Pour un litre de milieu :

- Corn Meal Agar poudre : 17,0 g± 0,5 g
- Pimaricine **(1)** ([finale] 10 ppm): 1,0 mL s.s. ± 0,1 mL
- Rifampicine **(2)** ([finale] 10 ppm): 2,5 mL ± 0,2 mL
- Ampicilline **(3)** ([finale] 250 ppm: 0,250 g ± 0,005g
- Methyl[1-[(butylamino) carbonyl]-1H-benzimidazol-2-yl]carbamate (=benomyl)**(4)**: 0,015 g ± 0,005g de prep commerciale
- Tachigaren 360 (hymexazole)**(5)**: 0,14 ± 0,01 mL
- Eau osmosée : 1000 mL ± 10 mL

Diluer le fongicide dans de l'eau osmosée. Ajouter le fongicide et les antibiotiques en fin de stérilisation, autour de 45°C, laisser agiter environ 10 mn.

Milieu CMA (Corn Meal Agar)

Pour un litre de milieu:

- Corn Meal Agar poudre : 17,0 g ± 0,5 g
- Eau osmosée : 1000 mL ± 10 mL

Milieu V8 (V8 agar)

Pour un litre de milieu:

- Jus de légumes clarifié : 200 mL ± 2 mL
- Agar-agar : 15 g ± 0,5 g
- Eau osmosée: 1000 mL ± 10 mL

(1) Nocif par inhalation, contact avec la peau et par ingestion. Porter un vêtement de protection approprié
(2) Toxique. Peut altérer la fertilité. Risques pendant la grossesse d'effets néfastes pour l'enfant. Nocif par inhalation, contact avec la peau et par ingestion. Irritant pour les yeux, les voies respiratoires et la peau. Eviter l'exposition, se procurer des instructions spéciales avant l'utilisation. En cas d'accident ou de malaise, consulter immédiatement un médecin (si possible lui montrer l'étiquette). Porter un vêtement de protection, des gants et un appareil de protection des yeux/du visage appropriés. Ne pas respirer les poussières
(3) Nocif, peut entraîner une sensibilisation par inhalation et par contact avec la peau. Ne pas respirer les vapeurs et aérosols. Porter un vêtement de protection approprié
(4) Nocif, peut entraîner une sensibilisation par contact avec la peau. Facilement inflammable. Dangereux pour les organismes aquatiques
(5) Irritant pour les yeux

ANNEXE 2 : GLOSSAIRE

Caduque :	Qui se détache facilement.
Chlamydospore :	Spore de conservation, unicellulaire et asexuée, à la paroi souvent épaissie et colorée.
Coralloïde :	Dont l'aspect tortueux rappelle le corail.
Hétérothallisme :	Condition où la reproduction sexuée n'est possible qu'entre différents thalles.
Homothallisme :	Condition où la reproduction sexuée peut avoir lieu sans interaction entre différents thalles.
Hyphe :	Filament du mycélium.
Mycélium :	Organe végétatif.
Oogone :	Cellule mère du gamète femelle.
Papille :	Protubérance située au niveau de l'ouverture du sporange.
Pédicelle :	Fragment d'hyphe restant attachée au sporange après que celui-ci se soit détaché du mycélium.
Sporange :	Organe produisant des spores asexuées de façon endogène (= sporocyste).
Swelling :	Renflement mycélien plus ou moins globuleux.

ANNEXE 3: Symptômes dus à *Phytophthora ramorum*

Sur *Rhododendron* sp. :



Photo: S. Werres, BBA Braunschweig

Nécrose sur rameau



Photo : INRA Nancy-Champenoux

Taches foliaires (face supérieure)

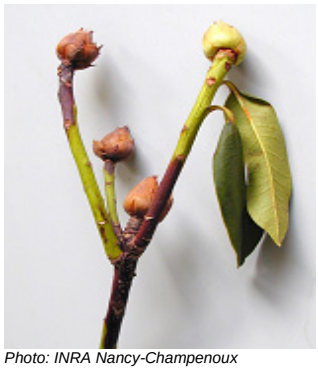


Photo: INRA Nancy-Champenoux

Nécroses boutons floraux

Sur *Viburnum* sp.



Photo : C. Lane, CSL, UK

Nécroses de pousses



Photo : C. Lane, CSL, UK

Taches foliaires



Photo : CSL (UK)

Nécroses à la base des tiges

Sur *Camellia* sp.



Photo : DEFRA (UK)



Photo : DEFRA (UK)

Taches foliaires

Sur *Pieris* sp.



Photo : DEFRA (UK)



Photo : C. Lane, CSL (UK)

Sur *Hamamelis virginiana*



Photo : DEFRA (UK)

Taches foliaires

Sur *Kalmia* sp.



Photo : C. Lane, CSL (UK)

Sur *Quercus falcata*



Photo: DEFRA (UK)

Sur *Fagus sylvatica*



Photo: DEFRA (UK)

Chancres parfois suintants

ANNEXE 4: Caractéristiques culturales de *Phytophthora ramorum*



Photo LNPV

Culture sur V8 agar (4 jours)

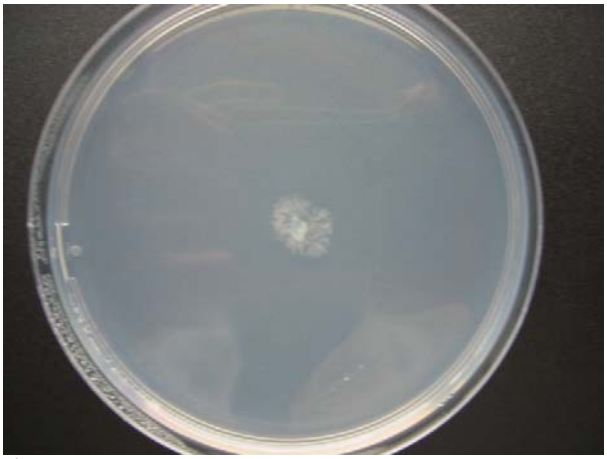


Photo LNPV

Culture sur Corn meal agar (4 jours)

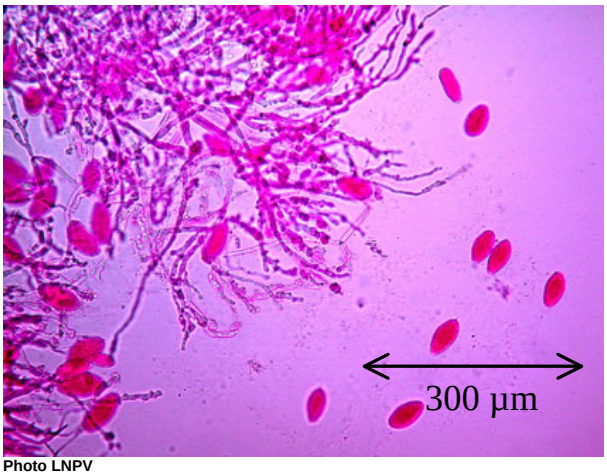


Photo LNPV

Mycélium coralloïde et sporanges (colorant : fuchsine)

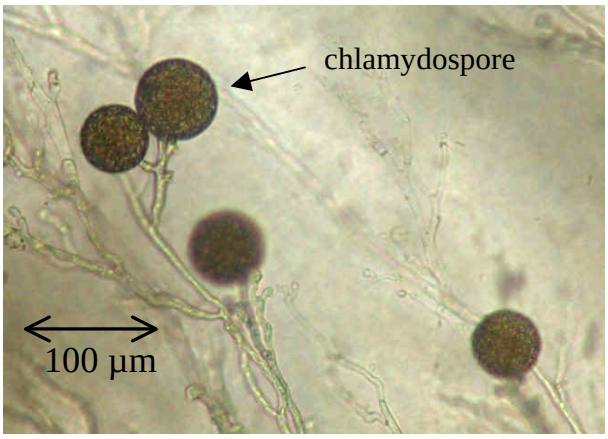


Photo LNPV

Chlamydospores (montage dans l'eau)

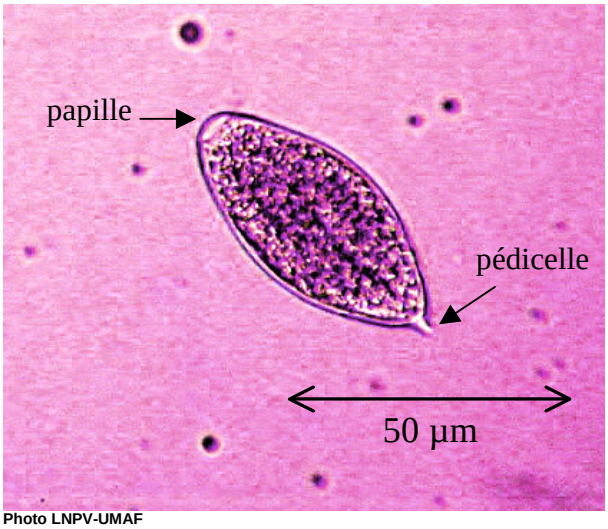


Photo LNPV-UMAF

Sporange semi-papillé, caduque à pédicelle court (colorant : fuchsine)

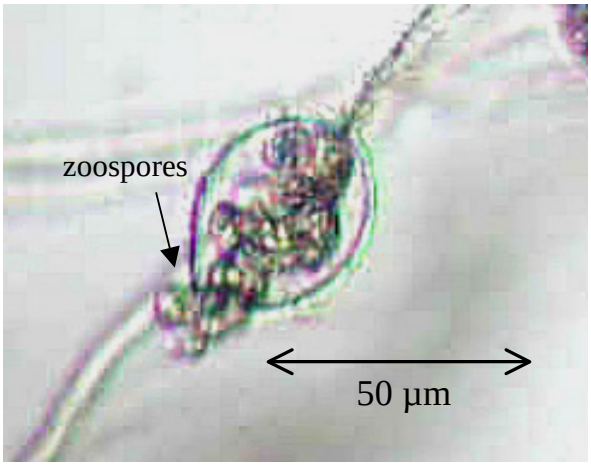


Photo LNPV-UMAF

Sporange libérant ses zoospores (montage dans l'eau)

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 de la santé des végétaux (ANSES),
7 rue Jean Dixméras, 49044 ANGERS cedex 01
lsv@anses.fr

Ce document est édité par :

Ministère chargé de l'agriculture
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.

METHODE OFFICIELLE D'ANALYSE

Détection *in planta* et identification en culture pure de : *Phytophthora ramorum* Werres, De Cock & Man in't Velt par la technique d'amplification par polymérisation en chaîne

Réf. : MOA 018 partie B version 1a

Droits de reproduction et Copyright

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

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

Dates de validité du présent document

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

Cependant, et sauf indication contraire explicite, la version précédente peut encore être utilisée pendant une durée maximale de 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 de la méthode.

n° méthode	Consultation publique		Validité	
Numéro de la version	Début	Fin	Début	Fin
MF/07/23 version a	-	-	2007	Avril 2011
MOA 018 partie B version 1a	Janvier 2011	Février 2011	Avril 2011	

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 14
6. Contrôles et témoins 15
7. Prise d'essai 16
8.Etapes de l'analyse 16
9. Résultats 20
9.1.Validation des analyses 20
9.2.Interprétation et formulation des résultats 21
10. Élimination des matériels susceptibles d'être contaminants 22
11. Conservation des reliquats de matériels utilisés 22

LISTE DES DOCUMENTS OFFICIELS APPELES PAR LA METHODE 23

BIBLIOGRAPHIE SUCCINCTE 24

ANNEXE 1 : diagramme decisionnel 25

PREAMBULE

OBJET DES METHODES OFFICIELLES

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

GLOSSAIRE, ABREVIATIONS ET DOCUMENTS CONNEXES

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

LIMITES IMPOSEES AUX LABORATOIRES AGREES OU RECONNUS

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

ÉCHANTILLONNAGE 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 (ou critique) est un réactif directement impliqué dans la reconnaissance des organismes recherchés ou dont la qualité peut affecter directement le résultat.
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.

Toute 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'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

La présente méthode a été adaptée par l'Unité de Mycologie du Laboratoire de la Santé des Végétaux. Elle s'appuie sur les pratiques courantes d'isolement et d'identification morphologiques des *Phytophthora* spp., sur les premières publications parues sur *Phytophthora ramorum* (Werres *et al.* notamment) ainsi que sur le protocole de diagnostic OEPP.

Le travail de relecture et de révision a été effectué par l'unité « Développement de méthodes et analyses » du même laboratoire.

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 publiées).

AMELIORATIONS

Changement de format dans l'écriture de la méthode, selon un nouveau standard.

DESCRIPTION DE LA METHODE

1.Objet.

Conformément à la décision de la Commission 2002/757/CE du 19 septembre 2002, modifiée par la décision 2007/201/CE du 27 mars 2007, relative aux mesures d'urgence phytosanitaires provisoires pour prévenir l'introduction et la dissémination au sein de l'Union européenne de *Phytophthora ramorum*, ce champignon est considéré comme un organisme réglementé.

L'objet de cette méthode est de détecter la présence de *P. ramorum* dans un échantillon prélevé sur plante hôte ou de confirmer l'identité d'un oomycète isolé en culture pure. La présence de *P . ramorum* est mise en évidence par deux tests PCR[1] (Polymerase Chain Reaction) consécutifs qui ciblent des *loci* différents et indépendants dans le génome de l'oomycète.

Cette méthode est qualitative, elle permet de détecter *P. ramorum* dans la limite du seuil de détection de la technique employée mais pas de le quantifier dans l'échantillon analysé.
Les échantillons pour lesquels une réponse négative est obtenue en première analyse sont considérés comme indemnes de *P. ramorum* ou contaminé à un niveau trop faible pour être mis en évidence par la technique utilisée.
Un échantillon pour lequel une réponse positive est obtenue par le premier test de détection est analysé par un second test PCR. Si une deuxième réponse positive est obtenue, l'échantillon est considéré comme contaminé par *P. ramorum*.

2.Domaine d'application.

Objets susceptibles d'être soumis à analyse.

La méthode permet de détecter *Phytophthora ramorum* sur les feuilles, rameaux et troncs de diverses espèces végétales[2]. Elle permet aussi de confirmer l'identification de *P. ramorum* isolé en culture pure.

Limitations relatives aux objets susceptibles d'être soumis à analyse

Cette méthode a initialement été mise au point et validée sur culture pure ainsi que sur organes végétatifs de végétaux.

Les échantillons doivent arriver au laboratoire en bon état, (propres, frais…). Dans le cas contraire, le laboratoire émet une réserve sur tout résultat d'analyse négatif en précisant l'état dégradé de l'échantillon à la réception au laboratoire.

Grandeur de l'objet soumis à analyse.

La méthode s'applique sur tissus végétatifs de toute taille présentant des symptômes (nécroses, colorations, suintements…) ainsi que sur tout fragment de culture pure.

[1] Le brevet de la technique PCR est détenu par la société Hoffmann – La Roche

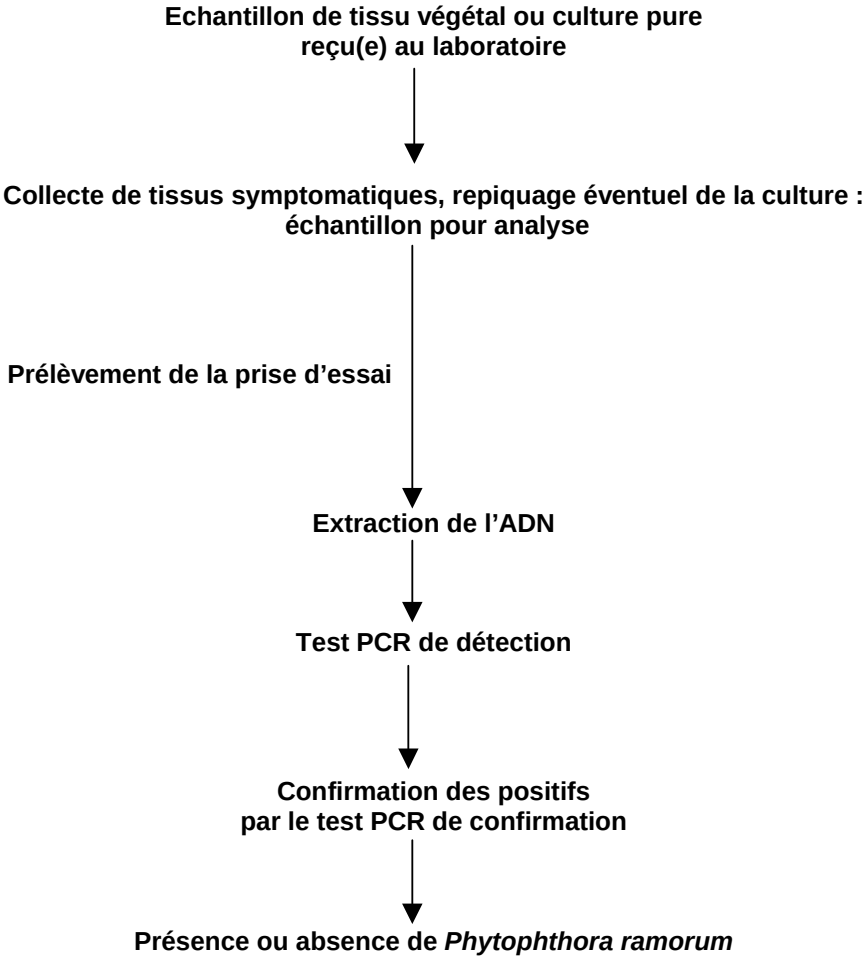
[2] Une liste officielle d'espèces végétales sensibles à *Phytophthora ramorum* a été établie par la Commission européenne (Décision communautaire 2002/757/CE du 19 septembre 2002, modifiée par la Décision 2007/201/CE du 27 mars 2007). Une liste nationale de végétaux à surveiller en priorité est régulièrement publiée par le biais d'une Note de service (DGAL-SDQPV). Ces listes sont très évolutives et non exhaustives, les espèces végétales susceptibles d'être analysées sont donc nombreuses et variées (arbres, arbustes, feuillus, conifères…).

Précaution(s) particulière(s) à prendre.
Le délai maximal entre la réception de l'échantillon et le début effectif de l'analyse doit être inférieur à 8 jours pour des échantillons végétaux prélevé dans de bonnes conditions ainsi que pour les culture pures. L'échantillon devra pendant ce temps être conservé à 5±3°C. Les prises d'essai en microtubes peuvent être conservées au congélateur jusqu'à 6 mois avant analyse.

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

Phytophthora ramorum a un statut de parasite réglementé, c'est à dire qu'il doit être manipulé dans de strictes conditions de quarantaine en accord avec la directive 2008/61/CE. Bien qu'il ne figure pas sur les listes de la directive 2000/29/CE, l'exigence pour la manipulation et le confinement de cet agent pathogène à dissémination aérienne doit être de type NS3.

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

Pour ces différents tampons, il existe des solutions commerciales prêtes à l'emploi ou à fabriquer à façon.

Tampon Tris EDTA (pH 8) :

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.

Tris Borate EDTA (TBE) : voir MOA REP 001

Tampon de charge d'ADN amplifié :

Un microlitre de tampon de charge est systématiquement mélangé à dix microlitres du produit d'amplification avant dépôt sur le gel d'électrophorèse. Selon le volume que l'on choisit de déposer dans le puit, adapter les chiffres donnés en respectant les mêmes proportions.

La composition de ce tampon préconisée pour cette méthode est la suivante :
- Bleu de Bromophénol : 0.25 % (Poids/volume)
- Xylène cyanol : 0.25 % (Poids/volume)
- Saccharose en solution dans du TBE 0.5 X : 40 % (Poids/volume)

Tampon Tris HCl (0.1 M, pH 8) : voir MOA REP 001

Tampon de l'ADN polymérase :

Il est fortement recommandé d'utiliser le tampon de polymérase fourni avec cette dernière par le fabricant. En général, le tampon est fourni à une concentration 10 fois supérieure à sa concentration finale dans le mix réactionnel de PCR.

4.2.Autres réactifs et consommables

Eau osmosée ou distillée : voir MOA REP 001
Cette qualité d'eau est requise pour la fabrication des différents tampons. L'eau doit être de qualité compatible avec les méthodes utilisées (absence d'activité nucléasique, absence d'effet inhibiteur de PCR et absence d'acide nucléique détectable).

Eau de qualité Ultra Pure : voir MOA REP 001
L'Eau Ultra Pure (EUP) doit présenter une qualité suffisante pour son utilisation en biologie moléculaire (exempte de DNase et d'acides nucléiques cibles amplifiables).

Eau de Javel ou solution d'hypochlorite de Sodium (NaOCl) titrant au moins 2° Cl [produit corrosif à manipuler avec précaution]

Kits d'extraction d'ADN :
L'ADN total des échantillons analysés (à la fois ADN végétal, ADN fongique, et éventuellement bactérien, viral etc.) est extrait et purifié à l'aide d'un mini kit d'extraction d'ADN de plante disponible dans le commerce.
La présente méthode a été validée avec le kit d'extraction décrit dans (Ioos et al. 2006). Le laboratoire peut choisir d'utiliser un autre kit, mais s'agissant d'une étape critique, les dispositions du paragraphe « modification des méthodes officielles » s'appliquent. En l'occurrence, le laboratoire doit apporter au LNR la preuve que le kit ou le protocole d'extraction interne au laboratoire utilisé (ex. CTAB/ Phénol-Chloroforme) a une efficacité au moins équivalente à ce dernier, les critères de performance de la méthode globale ainsi modifiée étant au moins équivalents à ceux de la présente méthode.

Oligonucléotides :

PCR de première détection

Séquence de l'amorce sens « **TRP-PRAM-F*** »:	5'- gag tag aaa ctt cgg gaa tg -3'
Séquence de l'amorce antisens « **TRP-PRAM-R*** »:	5'- gtt cgg cac att aac gca g -3'

* : Ioos *et al*., 2006

PCR de confirmation

Séquence de l'amorce sens « **GPA-PRAM-F*** »:	5'- taa gga aca agg tac caa ag -3'
Séquence de l'amorce antisens « **GPA-PRAM-R*** »:	5'- ctc agg aat tca ctc tca cg -3'

* : Ioos *et al*., 2006

Les solutions mères de chacune de ces amorces sont conservées au congélateur dans de l'eau ultra pure à une concentration de 100 µM.
Des parties aliquotes de ces solutions mères sont diluées au 10ème dans de l'eau ultra pure (soit 10 µM).
Ces parties aliquotes sont utilisées pour la préparation du mix réactionnel de PCR.

ADN polymérase thermostable :

La présente méthode a été validée avec la polymérase à ADN décrite dans Ioos *et al.* (2006). Le laboratoire peut choisir d'utiliser une autre ADN polymérase thermostable mais s'agissant d'un réactif critique, les dispositions du paragraphe « modification des méthodes officielles » s'appliquent. En l'occurrence, le laboratoire doit apporter au LNR la preuve de l'efficacité et la spécificité de la polymérase choisie lors d'essais préliminaires effectués sur extraits d'ADN total d'isolats référencés de *P. ramorum,* dans les conditions d'utilisation décrites par la présente méthode.
La polymérase à ADN doit être conservée au congélateur. La date de péremption doit être vérifiée avant utilisation et respectée.

Chlorure de Magnésium ($MgCl_2$) :
Ce dernier est fourni généralement par le fabricant avec l'ADN polymérase, en tube séparé ou directement en mélange dans le tampon de l'ADN polymérase.

Désoxyribonucléiques triphosphate (dNTPs) :

- 2'-desoxy-adenosine - 5'-triphosphate (dATP)
- 2'-desoxy-cytidine - 5'-triphosphate (dCTP)
- 2'-desoxy-guanosine - 5'-triphosphate (dGTP)
- 2'-desoxy-thymidine - 5'-triphosphate (dTTP)

Ces 4 désoxyribonucléiques triphosphates sont mélangés et conservés en solution équimolaire de 25mM pour chacun dans du Tris EDTA (pH 8, 0.5 M) : ="**dNTPs mix**" ou un tampon équivalent.

Bovine Serum Albumin (qualité biologie moléculaire):

Ce composé est livré sous forme de poudre. Il est reconstitué dans de l'eau ultrapure à raison de 10 mg/mL et stérilisé par filtration à travers une membrane de 0.2 µm. Il peut être conservé sous forme liquide jusqu'à 3 mois au réfrigérateur et 6 mois au congélateur.

Agarose : voir MOA REP 001

L'agarose utilisé doit être spécialement conçu pour la fabrication de gels d'électrophorèse. Etant donné le poids moléculaire des régions amplifiées (entre 250 et 800 paires de bases) ces derniers sont préparés à une concentration d'environ 1,5 g d'agarose pour 100 mL de TBE 0.5X.

Marqueurs de poids moléculaire : voir MOA REP 001

Il est recommandé d'utiliser une échelle de poids moléculaires comportant des fragments de tailles multiples de 100 paires de bases. Ceci permet d'estimer rapidement la taille des fragments amplifiés sur un gel et de la comparer à la taille attendue (ici 527 et 248 pb). Le mélange de marqueurs de poids moléculaire doit être préparé en suivant les préconisations du fournisseur.

Bromure d'éthidium :

Ce produit est dangereux par contact, inhalation et ingestion et a des propriétés mutagènes. Il faut donc le manipuler pur ou en dilution revêtu d'une blouse et en portant des gants adaptés.
Il est obligatoire de récupérer tous les déchets contenant potentiellement du bromure d'éthidium (gels, bains de teinture, de rinçage, gants, papier filtre, etc.) et de les stocker dans un conditionnement étanche avant de le faire retraiter et décontaminer par une société spécialisée.
Ce produit fluoresce lorsqu'il est exposé aux UV et s'il est intercalé entre les paires de base de l'hélice d'ADN.
Il est recommandé de se le procurer conditionné sous forme de préparation liquide prête à l'emploi conditionné dans un compte gouttes. Il est ensuite utilisé dans le bain de coloration à une concentration proche de 0.5 µg / mL.

Polyvinylpolypyrrolidone (PVPP) :

Ce produit est à utilisé sous forme de poudre.

Autres consommables à usage unique

- Microcônes stériles à filtre de volume adaptés
- Microtubes stériles de 2 mL
- Microtubes stériles pour PCR de volume adapté aux puits du thermocycleur utilisé, à paroi fine, individuels, en barrettes de 4, 8 ou en plaques 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:

- Broyeur de tissu oscillant (de type « beadbeater ») avec adaptateur et portoirs pour tubes de 2 mL
- Thermocycleur programmable pour PCR conventionnelle
- 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)

L'utilisation des contrôles et témoins définis au point suivant 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.

6.Contrôles et témoins

La technique de détection de régions cibles d'ADN d'un organisme par PCR 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 les suivants (voir MOA GLO 001) :

[a] **Un témoin interne d'amplification (TIA), introduit dans le mélange réactionnel** (mix TRP-PRAM uniquement)**.** Ce témoin correspond à une solution de bactéries contenant un plasmide dans lequel a été inséré un fragment d'ADN sur lequel on a artificiellement greffé la zone cible des amorces de PCR TRP-PRAM-F/R. Ce fragment est de taille supérieure à la taille de la cible chez *P. ramorum* (environ 720 pb).
La présence de ce témoin dans le mix réactionnel permet d'amplifier en parallèle un fragment d'environ 720 pb lorsque les S-ADN cibles testées ne contiennent pas suffisamment d'inhibiteurs. Il permet de mettre en évidence les échantillons qui ne seraient pas exploitables par PCR du fait de la présence d'inhibiteurs dans l'extrait («= faux négatifs »). Attention, le TIA sera amplifié même pour le témoin négatif car il est ajouté directement dans le mélange réactionnel.

[b] **Un témoin positif de processus (T+$_{PROC}$)**. Il s'agit d'un tube témoin soumis à toutes les étapes en partant de l'extraction, en substituant à la prise d'essai de la matrice artificiellement dopée par l'ajout d'une quantité suffisante pour être détectée de séquence cible. Il permet de vérifier le bon déroulement de l'extraction.

[c] **Un témoin négatif de processus (T-$_{PROC}$) ou un témoin négatif d'extraction ('Textr')** sera préparé pour toute série d'extraction. Il s'agit d'une prise d'échantillon « vide » c'est à dire un microtube de 2 mL stérile vide qui subira toutes les phases de l'analyse pour vérifier l'absence de contamination lors de la phase d'extraction d'ADN. Il est possible de remplacer cet échantillon vide par un extrait d'ADN prêt à l'emploi ne présentant aucun risque d'amplification croisée avec les tests de PCR décrits ci après ou par un échantillon de tissus végétal (feuille de rhododendron par exemple) reconnu non contaminé par *P. ramorum* (témoin négatif de processus, T-$_{PROC}$). L'un ou l'autre sera testé lors de chaque réaction de PCR pour vérifier l'absence de contamination croisée entre échantillons ou de contamination externe lors de la phase d'extraction d'ADN.

[d] **Des témoin positifs d'amplification** (**T+TRP-Pr ou T+GPA-Pr**) correspondant soit à un extrait d'ADN génomique d'un isolat référencé de *P. ramorum*, soit à des solutions de bactéries contenant un plasmide dans lequel a été insérée la zone cible (respectivement 527 et 248 pb) des amorces de PCR TRP-PRAM-F/R ou GPA-PRAM-F/R. Les solutions de témoins positifs sont conservées au congélateur. Ces contrôles seront systématiquement testés conjointement aux prises d'essais lors de toute série de PCR. Il s'agit de contrôles positifs permettant de vérifier que les mélanges réactionnels ont été correctement préparés et que les conditions d'amplification par PCR ont été respectées.

[e] **Des témoins positifs en limite pratique de détection (TLOD TRP PRAM et TLOD GPA PRAM)** : il permettent de vérifier que la réaction PCR s'est effectuée de façon optimale (conditions thermodynamique et chimique) pour que la plus petite quantité détectable de *P. ramorum* puisse avoir été détectée dans un échantillon. Ces T+$_{LOD}$ sont constitués d'une solution calibrée d'ADN génomique

d'une souche référencée de *P. ramorum* ou de solutions calibrées de plasmides bactériens dans lesquelles sont clonées les cibles du test PCR TRP-PRAM ou GPA-PRAM. Ces $T+_{LOD}$ doivent être caractérisés par le laboratoire dans ses propres conditions. En pratique, les $T+_{LOD}$ peuvent être définis comme la plus petite quantité de cible produisant un résultat positif dans 100 % des cas.

[f] **Un témoin négatif d'amplification** (**T-**) sera systématiquement introduit lors de chaque réaction de PCR. Une prise d'échantillon "eau" subira donc toutes les phases de l'analyse à partir de la préparation du mélange réactionnel de PCR pour vérifier l'absence de contamination lors de cette phase et lors du chargement des S-ADN cibles dans les tubes individuels de PCR

Remarque : 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.

•Sur échantillons végétaux : chancre ou nécrose sur rameau, bourgeon ou feuille.

Sur un échantillon présentant un de ces symptômes, de fines lamelles de la zone atteinte (autour de 2-3 mm dans les trois dimensions pour chacune d'entre elles) seront prélevées à l'aide d'une lame de scalpel stérile et placées dans un microtube plastique stérile de 2 mL qu'on refermera immédiatement. Prélever uniquement dans la zone du chancre ou en limite de la zone nécrosée.
Pour un chancre ou une tache donnés, un volume maximum de 300-400 µL sera prélevé, ce qui constituera la prise d'essai. Il faut impérativement éviter de remplir le tube au plus du quart de son volume car ceci rendrait son analyse impossible.

•Sur culture pure :

Le prélèvement doit s'effectuer sur une culture d'oomycète de moins de 15 jours. Sur une culture pure d'oomycète, une fine lamelle de culture (environ 5 x 10 mm en surface, pour environ 1 mm en profondeur) est prélevé à l'aide d'une lame de scalpel ou d'une pointe stérile. La récolte est placée dans un tube PCR contenant environ 100 µL de Tris EDTA et qu'on refermera immédiatement. Ceci constituera la prise d'essai.

Précautions à prendre lors de la prise d'essai :
Pour chaque nouveau prélèvement, une nouvelle paire de gants ainsi qu'une nouvelle lame de scalpel devront être utilisées. Il est fortement conseillé d'utiliser des scalpels stériles jetables conditionnés sous blister. Un même scalpel peut être utilisé sous réserve i) de le désinfecter par flambage à l'alcool ou ii) de le désinfecter par trempage quelques secondes dans une solution d'eau de javel à environ 5° chlorométriques suivi d'un rinçage à l'eau stérile.

8.Etapes de l'analyse

L'ensemble des opérations décrites ci-après doit s'effectuer en portant des gants à usage unique. La paire de gants doit être systématiquement changée dès que la prise d'essai, à quelque stade du mode opératoire que ce soit, a été accidentellement mise en contact avec celle-ci.

8.1. Broyage des prises d'essai pour détection *in planta*

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

a) Prélever deux billes de broyage.
b) Ouvrir le microtube contenant la prise d'essai et y transférer les billes
c) Prélever à l'aide d'une micropipette l'intégralité du volume de tampon de lyse préconisé par le fabricant pour une mini extraction d'ADN. Le tampon de lyse est fourni avec le kit d'extraction. Transférer le tampon de lyse dans le tube. Selon le type de kit d'extraction d'ADN utilisé, il sera parfois nécessaire à cette étape d'ajouter la RNAse, enzyme qui dégrade les molécules d'ARN. Le volume à ajouter est celui préconisé par le fabricant. Ajouter environ 2 à 3 mg de PVPP en poudre.
d) Refermer le tube de façon parfaitement étanche. Retourner en l'agitant plusieurs fois le microtube.
e) Placer le microtube sur le portoir du broyeur et broyer environ 2 minutes à une fréquence d'agitation d'environ 30 Hz.
f) Pendant la phase de broyage, arrêter à au moins une reprise l'agitation et retourner en l'agitant ou vortexant plusieurs fois le microtube.

Pour toute série d'extractions, un blanc d'extraction sera effectué. Une prise d'échantillon "vide" (= "**Textr**") subira donc toutes les phases de l'analyse pour vérifier l'absence de contamination lors de la phase d'extraction d'ADN (1er type de faux positif). Il est possible de remplacer cet échantillon vide par un extrait d'ADN prêt à l'emploi ne présentant aucun risque d'amplification croisée avec les tests de PCR décrits ci après (témoin négatif de processus, **T-proc**).

8.2. Extraction et purification de l'ADN Total

8.2.1. Extraction d'ADN à partir de tissu végétal potentiellement infecté

a) Le microtube contenant la prise d'essai broyée est incubé au bain marie ou au bain à sec pendant environ 10 min ± 2 min à la température préconisée par le fabricant de kits d'extraction (généralement autour de 65°C ±3°C). Pendant l'incubation, vortexer chaque tube à au moins une reprise pour ré-homogénéiser leur contenu qui aura tendance à précipiter.
b) Suivre ensuite le protocole d'extraction et de purification indiqué par le fabricant en y incluant obligatoirement au préalable une phase de centrifugation (3-5 min à une vitesse de rotation permettant d'obtenir une accélération de 10 à 14 000 g) permettant de culotter les débris cellulaires. Prélever le surnageant pour poursuivre l'extraction.
c) A la fin du mode opératoire prescrit par le fabricant, l'ADN total extrait est élué dans un volume final autour de 100 µL de tampon d'élution. Cette solution d'ADN total constituera la solution d'ADN directement analysée par PCR (= "**S-ADN cible**"). Toutefois, pour anticiper la présence d'effet inhibiteur dans S-ADN cible, il est possible de diluer cette solution au 10ème dans le tampon d'élution ou équivalent. La solution « S-ADN cible » sera analysée ainsi que l'éventuelle « S-ADN cible /10ème ».

8.2.2. Extraction d'ADN à partir de culture pure d'oomycète

a) Le microtube de PCR contenant la lamelle de culture pure dans le Tris EDTA est chauffé dans le bloc du thermocycleur à une température entre 95 et 99 °C pendant environ 3 à 5 min, puis immédiatement incubé dans de la glace pilée pendant 2 minutes.
b) Refaire une fois le point a)
c) Ces cycles de chauffage/refroidissement permettent de libérer une quantité suffisante d'ADN total dans le tampon Tris EDTA pour être testé par PCR. Cette solution d'ADN total constituera la solution d'ADN directement analysée par PCR (= "**S-ADN cible**").

8.3. Test de la solution d'ADN cible par PCR «TRP-PRAM-F/R » (test de détection) et «GPA-PRAM-F/R » (test de confirmation)

8.3.1. Préparation des mélanges réactionnels TRP-PRAM-F/R et GPA-PRAM-F/R

La préparation des mélanges réactionnels (="**mix**") s'effectuera de préférence dans une zone physiquement séparée de la zone où s'est effectuée l'extraction et la purification de l'ADN total. Elle requiert en outre l'utilisation d'un jeu de micropipettes uniquement réservé à cet effet.

Le volume réactionnel individuel (="**Vreac**") choisi doit se situer entre 20 et 30 µL.

La composition finale est la suivante :

Mix TRP-PRAM-F/R :

Composé	Concentration finale dans Vreac
Eau Ultra Pure	qsp Vreac
Tampon de polymérase à ADN (10 X) fourni avec la polymérase à ADN	1 X
Bovine Serum Albumin (10 mg/mL)	0.6 µg /µL
Chlorure de Magnésium 25 mM	2 mM
Amorce sens "TRP-PRAM-F" (10 µM)	0.45 µM
Amorce antisens "TRP-PRAM-R" (10 µM)	0.45 µM
T.I.A. (2.5 UFC./µL)	5 UFC /20 µL de Vreac
dNTPs mix 4 x 25 mM	4 x 200 µM
Polymérase à ADN	0.66 U / 20 µL de Vreac

Mix GPA-PRAM-F/R:

Composé	Concentration finale dans Vreac
Eau Ultra Pure	qsp Vreac
Tampon de polymérase à ADN (10 X) fourni avec la polymérase à ADN	1 X
Bovine Serum Albumin (10 mg/mL)	0.6 µg /µL
Chlorure de Magnésium 25 mM	2 mM
Amorce sens "GPA-PRAM-F" (10 µM)	0.45 µM
Amorce antisens "GPA-PRAM-R" (10 µM)	0.45 µM
dNTPs mix 4 x 25 mM	4 x 200 µM
Polymérase à ADN	0.66 U / 20µL de Vreac

a) Chaque mix se prépare dans un microtube stérile de 1,5 ou 2 mL et est conservé dans de la glace pilée.
b) Les différents composants, exceptée la Polymérase à ADN, sont mis à décongeler sur la paillasse à température ambiante puis homogénéisés par vortexage. Il sont ensuite conservés dans de la glace pilée lors de la préparation du mix.
c) Les différents composants sont ajoutés au microtube stérile à l'aide de micropipettes obligatoirement munies de microcônes stériles à embout filtre.
d) La polymérase à ADN est ajoutée en dernier dans le mix et doit toujours être manipulée hors du congélateur dans la glace pilée.
e) Le microtube contenant le mix complet doit être passé au vortex pendant 10 secondes avant sa distribution. Le mix est conservé dans de la glace pilée avant sa distribution.

Remarque : la glace pilée n'est pas nécessaire pour ces différentes étapes si l'on utilise une polymérase de type Hotstart .

8.3.2. Distribution du mix dans les microtubes de PCR

a) Le mix est distribué dans les microtubes de PCR individuels ou en barrettes correctement identifiés et placés dans de la glace pilée (sauf si polymérase type Hotstart). Le volume distribué (="**Vdist**") est fonction du Vreac choisi : **Vdist = Vreac - (Vreac/10).** (soit 18 µL pour un **Vreac** de 20 µL).
b) **Vdist** est distribué dans chaque tube de PCR à l'aide une micropipette munie obligatoirement d'un microcône stérile à embout filtre.
c) Les tubes restent ouverts jusqu'à addition de l'extrait d'ADN à tester.

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

a) Les différentes solutions S-ADN cible et le cas échéant les S-ADN cible 1/10ème correspondant aux différents prises d'essai à tester sont ajoutées une par une dans chaque tube de PCR à l'aide d'une micropipette munie d'un microcône stérile à embout filtre. Ne pas oublier de changer systématiquement de microcône stérile à embout filtre à chaque addition de solution S-ADN cible. Le volume de **S-ADN cible** (="**V-ADN cible**") est fonction du **Vreac** choisi : **V-ADN cible = Vreac/10** (soit 2 µL pour un **Vreac**=20 µL).
b) Les **S-ADN cibles** des différents témoins sont ajoutés : **Textr, T+TRP-Pr ou T+GPA-Pr,** etc.. Pour le **T-,** on substitue à la **S-ADN cible** un même volume d'eau ultra pure.
c) Si le thermocycleur utilisé n'est pas équipé d'un couvercle chauffant, le **Vreac** est ensuite recouvert d'huile minérale stérile certifiée exempte de DNAase et de RNAase.
d) Les microtubes sont ensuite refermés de façon étanche et transférés dans le bloc du thermocycleur

8.3.4. Paramètres de l' amplification par polymérisation en chaîne.

Les différents paramètres de la PCR espèce spécifique pour la détection de *P. ramorum* sont les suivants (Ioos *et al.,* 2006) :

Etape		**Température de consigne**	**Durée programmée**	**Nombre de cycles**
1	Dénaturation initiale	95 °C	- **3 min** pour une polymérase classique - **8 min** pour une polymérase liée à un anticorps (type Hotstart)	1
2	Dénaturation	94°C	30 sec	**35**
	Hybridation	**58°C**	30 sec	
	Polymérisation d'ADN	72 °C	60 sec	
3	Elongation finale	72°C	7 min	1
4	Conservation (facultatif)	7°C	Jusqu'à intervention du manipulateur	-

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

8.3.5. Séparation par électrophorèse et révélation des gels d'électrophorèse

Définition : à une prise d'essai ayant abouti à une solution d'ADN total (**S-ADN cible**) correspond un tube de PCR dans lequel a été généré un produit d'amplification ou "**amplifiat**" (le terme ne préjuge pas du fait qu'il y ait eu effectivement amplification ou non).

8.3.5.1.- Electrophorèse

Il est très fortement recommandé de manipuler les amplifiats (ouverture des tubes de PCR, dépôts sur gel et électrophorèses) dans une zone distincte du reste des manipulations (pièce séparée). Ceci permet de se prémunir un minimum des risques d'autocontamination (risques de faux positifs).

a) Préparer un gel d'agarose à environ 1,5% (ou équivalent) à l'aide de tampon TBE à 0.5 X , prévoir une taille de gel et un type de peigne adaptés au nombre de tubes de PCR traités plus un pour le marqueur de poids moléculaire.
b) Déposer le gel refroidi dans la cuve d'électrophorèse, vérifier qu'il est suffisamment recouvert de tampon d'électrophorèse, sinon compléter.
c) Facultatif mais recommandé : préparer un plan de gel sur lequel est indiqué l'emplacement de chaque amplifiat ainsi que l'emplacement des différents témoins et du marqueur de poids moléculaire.
d) Pour n tubes de PCR déposer n gouttes de 2 µL de tampon de charge dans n puits d'une plaque de microtitration ou sur une feuille de parafilm. *nota* : le tampon de charge peut être directement ajouté au produit d'amplification dans le tube de PCR au prorata du **Vreac.**
e) Prélever chaque amplifiat (8 µL) et le mélanger délicatement par aspiration refoulement avec le tampon de charge.
f) Déposer délicatement l'amplifiat mélangé au tampon de charge dans le puit correspondant.
g) Lorsque tous les amplifiats, les différents contrôles et le marqueur de masse moléculaire sont déposés sur le gel, mettre en marche le générateur de tension (4V / cm , pendant 1 heure)

8.3.5.2. Révélation du gel d'électrophorèse

Il est très fortement recommandé de réserver une pièce spécifique pour la manipulation du bromure d'éthidium (coloration des gels, lavage des gels et exposition aux UV) et d'en contrôler l'accès aux seules personnes autorisées.

a) Après l'électrophorèse, le gel est incubé environ 15 min dans une cuve contenant de l'eau additionnée de bromure d'éthidium à la concentration d'environ 0.5 µg/mL. La cuve peut être disposée sur un agitateur à bascule.
b) Le gel est ensuite incubé au moins 1 min dans une cuve de "lavage" contenant de l'eau du robinet, également disposée sur un agitateur à bascule.
c) Le gel est ensuite placé sur un transilluminateur à UV (250 à 300 nm) en veillant à ne pas exposer le manipulateur au rayonnement (port un casque à visière filtrante ou utilisation d'une planche filtrante à déposer sur le transilluminateur).
d) Il est conseillé d'effectuer une prise de vue du gel exposé aux UV et d'utiliser cette prise de vue (impression ou fichier informatique) pour analyser les résultats. La prise de vue devra s'effectuer rapidement, car l'ADN est dégradé lors d'une exposition prolongée aux UV.

9. Résultats

9.1.Validation des analyses

La validation des analyses s'effectue en observant les résultats des amplifiats générés à partir des différents témoins.
Une série d'analyses (même réaction de PCR) est considérée validée si et seulement si l'ensemble des conditions suivantes est réuni :

- Le **T-** ne présente aucun fragment amplifié de 527pb (test de détection) ou 248 pb (test de confirmation) visible => il n'y a pas eu de contamination accidentelle pendant la préparation du mix et l'ajout des **S-ADN cibles**.
- Le **T+TRP-Pr** (test de détection) ou le **T+GPA-Pr** (test de confirmation) présente un fragment amplifié visible et de taille attendue (respectivement 527 et 248 pb) et => les conditions de PCR et la composition du mix de PCR ont permis d'amplifier spécifiquement et avec un rendement suffisant la séquence cible chez *P. ramorum*.
- Le **T LOD** présente un fragment amplifié visible et de taille attendue (527 pb pour le test de détection et 248 pb pour le test de confirmation).
- Le **Text** et le cas échéant le **T-proc** ne présentent aucun fragment amplifié de 527 ou 248 pb visible => il n'y a pas eu de contamination accidentelle pendant la phase d'extraction et de purification d'ADN jusqu'à l'obtention des **S-ADN cibles**.

De plus, pour le test PCR TRP-PRAM-F/R uniquement et pour tout extrait d'ADN ne présentant pas de fragment amplifié de taille attendue (527 pb), il est nécessaire que,:

- Le **TIA** présente un fragment amplifié visible et de taille attendue (environ 720 pb).
- Le **T+$_{\text{PROC présente}}$** un fragment amplifié visible et de taille attendue (527 pb).

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

9.2.Interprétation et formulation des résultats

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

- Si pour une S-ADN cible testée par PCR « TRP-PRAM-F/R », un fragment amplifié est visible et qu'il a la taille attendue (environ 527 pb), la prise d'essai est dite positive pour *Phytophthora ramorum* par le test PCR TRP-PRAM-F/R. Cette S-ADN cible sera testée pour confirmation par PCR « GPA-PRAM-F/R ».

- Si pour une S-ADN cible testée, aucun fragment amplifié n'est visible ou qu'il n'a pas la taille attendue, la prise d'essai est dite négative pour *Phytophthora ramorum*. Le résultat sera alors exprimé par une phrase du type " ***Phytophthora ramorum*** **non détecté dans l'échantillon analysé par PCR espèce-spécifique »**, en citant la méthode ci-décrite et en précisant le seuil de détection de la méthode[3].

- Si pour une S-ADN cible testée, ainsi que pour ses dilutions éventuelles, aucun fragment amplifié n'est visible et que le TIA n'a pas été correctement amplifié, le résultat sera alors exprimé par une phrase du type « **échantillon non analysable, présence d'inhibiteurs** »

Et, dans le cas d'une confirmation de positif par le test PCR GPA-PRAM-F/R :

- Si pour une S-ADN cible testée par PCR « GPA-PRAM-F/R », un fragment amplifié est visible et qu'il a la taille attendue (environ 248 pb), la prise d'essai est dite positive pour *Phytophthora ramorum* par le test PCR GPA-PRAM-F/R. Le résultat sera alors exprimé par une phrase du type « ***Phytophthora ramorum*** **détecté dans l'échantillon analysé par PCR espèce-spécifique** ».

- Si pour une S-ADN cible testée, aucun fragment amplifié n'est visible ou qu'il n'a pas la taille attendue, la prise d'essai est dite négative pour *Phytophthora ramorum* par PCR GPA-PRAM-F/R. Le deuxième test ne confirmant pas le premier, il sera nécessaire de procéder à l'analyse d'une nouvelle prise d'essai. Si cette deuxième analyse (détection+confirmation) donne le même

[3] 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

résultat, il sera alors exprimé par une phrase du type " **Présomption de présence de *Phytophthora ramorum* dans l'échantillon analysé par PCR espèce-spécifique ».**

Le diagramme décisionnel présenté en **annexe 1** 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
Méthode MF/07/23a	Détection *in planta* et identification en culture pure de : ***Phytophthora ramorum*** Werres, De Cock & Man in't Veld par la technique d'amplification par polymérisation en chaîne
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	Dossier de validation de la méthode MF/07/23a
REP 001	Répertoire des recettes en vigueur au LNPV
GLO 001	Glossaire des termes techniques en vigueur au LNPV

BIBLIOGRAPHIE SUCCINCTE

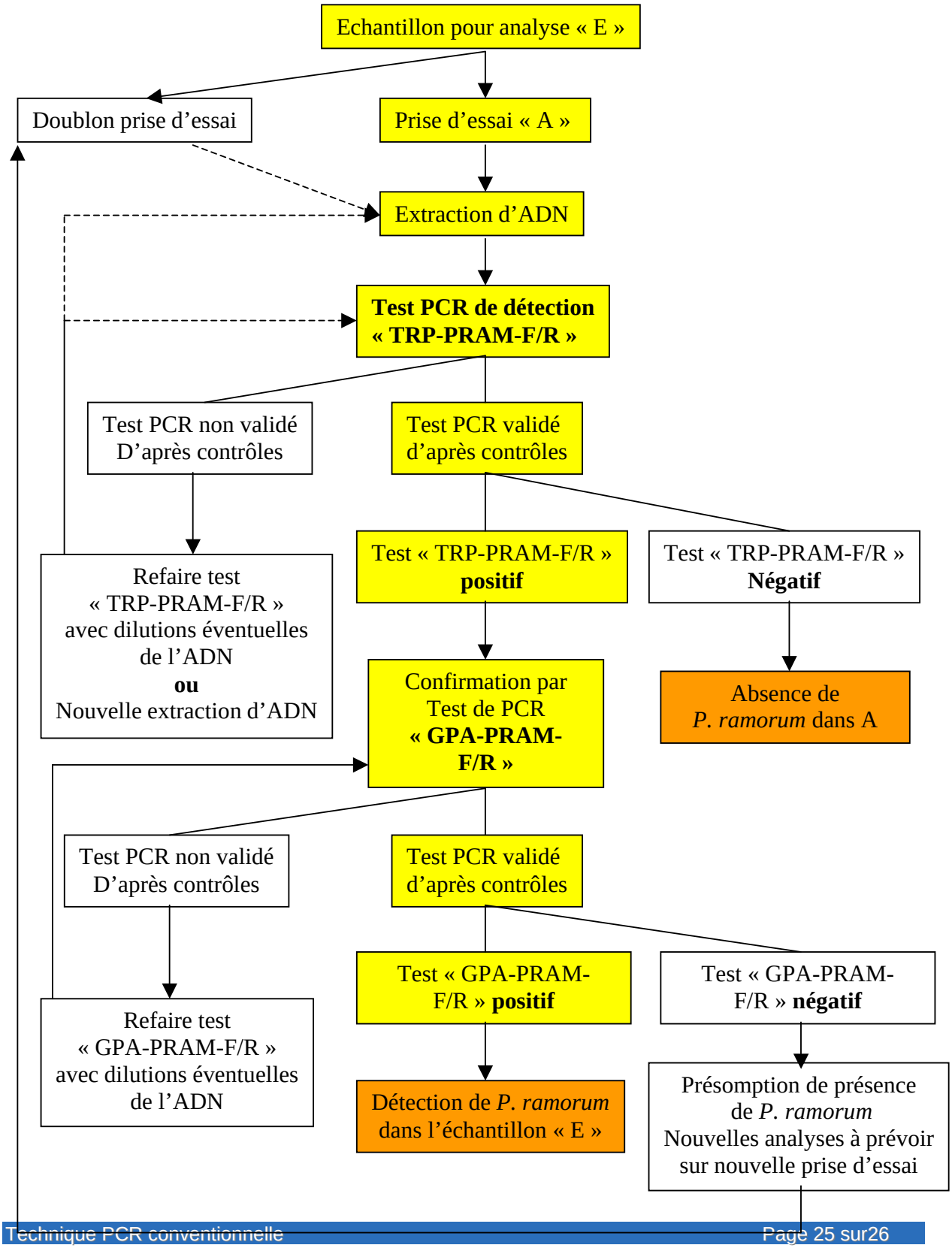
Anonyme (2007). Décision de la commission du 27 mars 2007 (2007/201/CE) modifiant la décision 2002/757/CE relative à des mesures provisoires d'urgence en matière phytosanitaire visant à empêcher l'introduction et la propagation dans la Communauté de *Phytophthora ramorum* Werres, De Cock & Man in 't Veld sp.nov. .

Anonymous (2002). Commission Decision (2002/757/EC) of 19 September 2002 on provisional emergency phytosanitary measures to prevent the introduction into and the spread within the Community of *Phytophthora ramorum* Werres, De Cock & Man in 't Veld sp. nov. OJ N° L252, 2002-09-20, 3739.

Ioos R. and Frey P. (2000) Genomic Variation within *Monilinia laxa*, *M. fructigena* and *M. fructicola*, and application to species identification by PCR. *European Journal of Plant Pathology* 106 (4) : 373-378.

Ioos R., Laugustin L., Rose S., Schenck N., Husson C., Frey P. (2006) Usefulness of single copy genes containing introns in *Phytophthora* for the development of detection tools for the regulated species *P. ramorum* and *P. fragariae*. European Journal of Plant Pathology 116: 171-176.

ANNEXE 1 : DIAGRAMME DECISIONNEL



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 de la santé des végétaux (ANSES),
7 rue Jean Dixméras, 49044 ANGERS cedex 01
lsv@anses.fr

Ce document est édité par :

Ministère chargé de l'agriculture
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.