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/2011-08-001
MOD10.21 E 01/01/11

NOTE DE SERVICE

DGAL/SDQPV/N2011-8181

Date: 01/08/2011

Date de mise en application :	Immédiate
Abroge et remplace :	Sans objet
Date d'expiration :	Sans objet
Date limite de réponse/réalisation :	Sans objet
Nombre d'annexe :	1
Degré et période de confidentialité :	Aucune

Objet : Méthode officielle d'analyse MOA 020 partie A version 1a relative à la détection de *Bursaphelenchus xylophilus* par PCR temps réel sur bois de conifères

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 020 partie A version 1a relative à la détection de *Bursaphelenchus xylophilus* par PCR temps réel sur bois de conifères.

Mots-clés : Nématologie - méthode officielle – analyses - détection – *Bursaphelenchus xylophilus*– bois – conifères

Destinataires

Pour information :
- DRAAF-SRAL
- DAAF-Service de l'alimentation
- Anses-Laboratoire de la santé des végétaux (LSV)

Le nématode du pin, *Bursaphelenchus xylophilus*, est un parasite qui attaque de façon sévère les conifères et cause la maladie dite « maladie du dépérissement du pin » (ou « pine wilt disease »). *B. xylophilus* est listé en annexe II, partie A, chapitre I de la directive 2000/29/CE.

La présente note a pour objet la publication officielle de la méthode de détection de *Bursaphelenchus xylophilus* par PCR temps réel sur bois de conifères. Celle-ci permet de détecter la présence de ce nématode dans des échantillons de bois de conifères, par extraction des nématodes (échantillon mis en contact avec l'eau, les nématodes vont ainsi migrer dans l'eau) puis détection par PCR temps réel.

Cette méthode doit être utilisée pour les analyses officielles en surveillance du territoire. Tout résultat positif obtenu avec cette méthode d'analyse doit être confirmé par une analyse morphologique et PCR conventionnelle réalisée par le laboratoire de référence, à savoir l'unité de nématologie du Laboratoire de la santé des végétaux de l'Anses basé au Rheu (35).

Vous trouverez en annexe à cette note d'information la méthode officielle d'analyse pour la détection de *Bursaphelenchus xylophilus*, MOA020 partie A version 1a.

Le directeur général adjoint

Jean Luc ANGOT

METHODE OFFICIELLE D'ANALYSE

Détection de *Bursaphelenchus xylophilus* par PCR temps réel sur bois de conifères

Réf. : MOA 020 partie A version 1a

Droits de reproduction et Copyright

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

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

Dates de validité du présent document

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

Cependant, et sauf indication contraire explicite, la version précédente peut encore être utilisée pendant une durée maximale de 18 mois à compter de la date de publication de la nouvelle version, afin de tenir compte des cycles d'accréditation auxquels sont soumis les laboratoires de référence, agréés et reconnus officiellement.

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

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

n°méthode	Consultation publique		Validité	
Numéro de la version	Début	Fin	Début	Fin
MOA020 partie A version 1a	Mars 2011	Mai 2011	Juin 2011	

SOMMAIRE

PREAMBULE 4

Objet des méthodes officielles 4
Glossaire, abréviations et documents connexes 4
Limites imposées aux laboratoires agréés ou reconnus 4
Échantillonnage et échantillon 4
Modification des méthodes officielles 4
Considérations d'ordre métrologique 5
Obligations réglementaires et limites de responsabilité 5
Revue des méthodes officielles, amendement et modification 6

ORIGINE DE LA METHODE ET REMERCIEMENTS 7

PRINCIPALES MODIFICATIONS PAR RAPPORT A LA VERSION PRECEDENTE 8

Modifications 8
Améliorations 8

DESCRIPTION DE LA METHODE 9

1. Objet. 9
2. Domaine d'application 9
3. Présentation schématique de la détection 9
4. Matériel et consommables 10
   4.1. Etape d'extraction des nématodes à partir du bois 10
   4.2. Etape d'extraction de l'ADN et détection par PCR temps réel 10
5. Contrôles et témoins 11
6. Prise d'analyse 12
7. Mode opératoire 12
   7.1. Extraction des nématodes à partir du bois 12
   7.2. Conditionnement de l'extrait 12
   7.3. Extraction d'ADN 12
   7.4. Détection par PCR temps réel 13
8. Résultats 14
   8.1. Validation de l'analyse 14
   8.2. Interprétation des résultats 14
   8.3. Formulation du résultat d'analyse 15
9. Élimination des matériels susceptibles d'être contaminants 15
10. Conservation des reliquats d'échantillons utilisés 15

REMERCIEMENTS 16

LISTE DES DOCUMENTS OFFICIELS APPELES PAR LA METHODE 16

BIBLIOGRAPHIE SUCCINCTE 17

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 évaluée et rédigée par le Laboratoire de la Santé des Végétaux unité de nématologie du Rheu en se basant sur les outils PCR temps réel décrits dans les publications François *et al.,* 2007 et Ioos *et al.*, 2009.

Le travail de relecture et de révision a été effectué par l'unité « Développement de méthodes et analyses » du 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: la version v1c devient v2a). La méthode ainsi modifiée est considérée comme une nouvelle méthode.

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

MODIFICATIONS

Sans objet (première version publiée).

AMELIORATIONS

Sans objet (première version publiée).

DESCRIPTION DE LA METHODE

Le nématode du pin *Bursaphelenchus xylophilus* (Steiner & Buhrer 1934) Nickle 1970 est l'agent responsable du dépérissement des pins. Il se rencontre principalement sur *Pinus*, mais d'autres conifères tels que *Larix*, *Abies, Cedrus, Chamaecyparis, Pseudotsuga* et *Picea* peuvent aussi être hôtes de ce nématode.
Les nématodes sont transmis d'une plante-hôte à une autre par un coléoptère du genre *Monochamus*.

Le transport de bois infesté ou du vecteur contaminé constitue le mode de dissémination du parasite le plus probable au niveau international.

Le nématode visé est un organisme nuisible de quarantaine et, par voie de conséquence, soumis à la réglementation européenne (directive 2000/29 CE).

1. Objet.

La présente méthode décrit les modalités de détection du nématode du pin, *Bursaphelenchus xylophilus,* à partir du bois de conifères. Elle repose sur une extraction du nématode à partir du bois puis sur la détection de ce dernier dans l'extrait de bois en utilisant la technique par PCR temps réel.

2. Domaine d'application

Objets susceptibles d'être soumis à analyse

La méthode est applicable aux bois et écorces de conifères sous forme de copeaux, morceaux ou disques de bois.

Limitations relatives aux objets susceptibles d'être soumis à analyse

La taille et le volume minimaux des échantillons à prélever pour la recherche de *B. xylophilus* sont définis dans les notes de service correspondantes. Ils doivent permettre une mise en migration optimale avec le matériel standard d'un laboratoire.

Grandeur de l'objet soumis à analyse

Utiliser la totalité ou partie de l'échantillon reçu (quantité déterminée par le protocole de prélèvement) avec un volume maximal de 400 millilitres pour les copeaux et 20 cm de diamètre maximum pour les disques et les morceaux de bois. Dans le cas où le volume de l'échantillon dépasse 400 mL, homogénéiser et prélever au maximum 400 mL.

Précaution(s) particulière(s) à prendre

Dans le cadre du plan de surveillance, une incubation préalable est réalisée, notamment pour permettre une multiplication des nématodes éventuellement présents et augmenter la capacité de détection. Pour ce faire, les échantillons sont mis à incuber dans un sac en plastique fermé et si besoin légèrement humidifiés à l'aide d'un pulvérisateur à main (cas de bois très sec). Ils sont maintenus à une température d'environ 20℃ pendant une période minimale de 15 j ours à partir de la date de réception.

3. Présentation schématique de la détection

Erreur ! Source du renvoi introuvable.

4. Matériel et consommables

4.1. Etape d'extraction des nématodes à partir du bois

Le maillage des tamis spécifié dans la présente méthode ne fait pas l'objet d'exigences métrologiques. Il convient cependant de s'assurer du bon état des tamis de récupération.

Migration
- Filtre papier ou en cellulose
- Eau du robinet

- Cuvettes ou autres récipients de capacité adaptée
- Tamis de migration ou autre support de maille supérieure à 40 µm (passoire par exemple)

Récupération
- Tamis de récupération (mailles d'environ 20 µm au plus)
- Récipients pour conditionnement des extraits
- Pissette (eau du robinet)

4.2. Etape d'extraction de l'ADN et détection par PCR temps réel

En règle générale, le manipulateur doit veiller (par l'utilisation de produits et consommables dits de qualité biologie moléculaire, 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, sont suivies, ainsi que la conservation en cours d'utilisation. A défaut, le laboratoire définit les conditions qu'il juge les plus optimales.

- Eau Ultra Pure de qualité biologie moléculaire

- Kits d'extraction d'ADN
L'ADN total des extraits de bois (après extraction des nématodes à partir des échantillons de bois par la méthode dite de Baermann ou Baermann modifiée) est extrait et purifié à l'aide d'un kit d'extraction d'ADN disponible dans le commerce : kit QIAmp® (Qiagen®). Tout autre kit ou protocole d'extraction d'ADN peut être utilisé dès lors qu'il donne des résultats au moins équivalents à ceux obtenus avec le kit d'extraction d'ADN préconisé (1 nématode de *B. xylophilus* doit être détecté et la valeur du « Cycle threshold » (Ct) doit être inférieure à 25).

- Oligonucléotides

Cible	Amorces et sondes	Séquence 5'→ 3'
B. xylophilus	**BSatF**	TGACGGAGTGAATTGACAAGACA
	BSatRV	AAGCTGAAACTTGCCATGCTAAA
	BSatS	***FAM***-ACACCATTCGAAAGCTAATCGCCTGAGA-***BHQ1***
Plante/champignon	**18S uni-F**	GCAAGGCTGAAACTTAAAGGAA
	18S uni-R	CCACCACCCATAGAATCAAGA
	18S uni-P	***JOE***-ACGGAAGGGCACCACCAGGAGT-***BHQ1***

- ADN polymérase thermostable et tampon de polymérase

N'importe quelle polymérase à ADN peut être utilisée dès lors que les résultats obtenus sont au moins équivalents à ceux obtenus avec le kit utilisé lors de l'évaluation de la méthode. Dans ce cas, le tampon de polymérase utilisé est celui commercialisé par le fournisseur de la polymérase à ADN associée.
Ces réactifs peuvent être déjà compris dans un pré-mix commercial.

- Pré-mix commercial
Des mélanges réactionnels prêts à l'emploi commercialisés par plusieurs fournisseurs et contenant certains réactifs nécessaires à la réalisation de master mix de PCR en temps réel (tampon de polymérase, polymérase à ADN, dNTP, $MgCl_2$, etc.) peuvent être utilisés dès lors que les résultats obtenus sont au moins équivalents à ceux obtenus avec le kit utilisé lors de l'évaluation de la méthode (au minimum, vérifier la sensibilité et la spécificité).
Le protocole a été évalué en utilisant le pré-mix LightCycler® 480 Probes Master de la société Roche Diagnostics.

- Chlorure de magnésium ($MgCl_2$)
Ce réactif peut être, dans certains cas, déjà intégré dans un pré-mix commercial.

- Désoxyribonucléotides triphosphates (dNTPs)
Les quatre désoxyribonucléotides triphosphates (dATP, dCTP, dGTP, dTTP) peuvent être déjà intégrés dans un pré-mix commercial.

- **Autres consommables à usage unique**
  - embouts de pipette avec et sans filtre de volume adapté,
  - microtubes d'environ 2 mL,
  - microtubes, capillaires ou plaques pour PCR adaptés au thermocycleur temps réel utilisé,
  - billes de verre de 1 mm et 3 mm de diamètre.

En plus de l'appareillage courant d'un laboratoire de biologie moléculaire (pipettes, centrifugeuses, agitateur, bain-marie, …), le matériel suivant est nécessaire pour certaines phases de l'analyse :

- Broyeur de tissu oscillant pour microtubes d'environ 2 mL (par exemple Tissulyser, Qiagen®) ou matériel équivalent
- Appareil de PCR en temps réel et ordinateur de pilotage avec un logiciel permettant l'acquisition de fluorescence et l'évaluation automatique des cycles seuil.

5. Contrôles et témoins

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

- un témoin positif de processus (E+)[1] : extrait de bois contaminé naturellement ou artificiellement avec quelques individus de *B. xylophilus* (si possible 2 individus), traité à partir de l'étape d'extraction d'ADN dans les mêmes conditions que les extraits de bois à analyser.
- un témoin négatif de processus (E-) : extrait de bois non contaminé en *B. xylophilus*, traité à partir de l'étape d'extraction d'ADN dans les mêmes conditions que les extraits de bois à analyser ; ce contrôle peut éventuellement contenir des nématodes autres que *B. xylophilus.*
- un témoin positif de PCR (A+)[1] : il contient tous les éléments du mélange réactionnel, ainsi qu'un extrait d'ADN de *B. xylophilus* ; ce témoin permet de vérifier que la réaction de PCR s'est déroulée de façon correcte et permet une amplification des échantillons contaminés.
- un témoin négatif de PCR (A-) : il contient tous les éléments du mélange réactionnel mais aucun extrait d'ADN n'est ajouté ; cela permet de vérifier l'absence de contamination au cours de la réaction de PCR.

Ces témoins permettent de vérifier le bon fonctionnement des étapes d'extraction d'ADN et de PCR (extraction et amplification de l'ADN de *B. xylophilus* pour le contrôle positif et l'absence de contamination pour le contrôle négatif).

[1] Ce type de témoin peut être fourni par l'unité de nématologie du Laboratoire de la Santé des Végétaux

6. Prise d'analyse

L'analyse est réalisée sur des copeaux, morceaux ou disques de bois de conifères. Utiliser au maximum 400 mL de copeaux de bois ou des morceaux ou disques de bois de 20 cm maximum.

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.

7. Mode opératoire

7.1. Extraction des nématodes à partir du bois

L'échantillon est traité selon la méthode de Baermann modifiée décrite ci-dessous (cf. chapitre *1.2.2.2* de la *MOA012*) :

1. Placer l'échantillon à extraire sur un tamis ou une passoire de maille de 40 µm au moins, en intercalant un tissu type essuie tout ou filtre à lait entre l'échantillon et le tamis.
2. Le tout est placé dans une cuvette ou un contenant équivalent dans lequel on versera de l'eau du robinet jusqu'à recouvrir l'échantillon.
3. Laisser incuber 24 heures, les nématodes migrent alors dans l'eau de la cuvette. Après ce laps de temps, le tamis est retiré, l'eau de la cuvette est passée à travers un tamis de 20 µm afin de concentrer les nématodes présents dans la suspension.
4. Transférer le contenu du tamis de récupération dans un récipient de lecture à l'aide d'une pissette d'eau.

7.2. Conditionnement de l'extrait

1. L'extrait de bois obtenu est transféré dans un tube à fond conique d'au moins 30 mL.
2. Laisser décanter l'extrait au moins 3 heures à température ambiante.
   Remarque : l'extrait peut être placé au froid positif pour une plus longue conservation mais sa conservation ne doit pas excéder 7 jours à cette étape.
3. Réaliser une prise d'essai par échantillon en prélevant environ 1,5 mL au fond du tube puis les placer dans un microtube.
4. Centrifuger à environ 15000 g pendant 10 minutes environ (durée et accélération approximatives).
5. Eliminer le surnageant et conserver le culot.
   Remarque : à l'issue de cette étape, les tubes contenant le culot peuvent être stockés au congélateur (<-10°C) avant de procéder à la suite de l'analyse.

Cas particulier : si l'ensemble des débris présents au fond du tube à fond conique n'a pas pu être prélevé lors de l'étape 3, poursuivre le conditionnement décrit dans les étapes 4 et 5 puis procéder à un nouveau prélèvement d'environ 1 mL au fond du tube à fond conique. Le déposer sur le premier culot (obtenu au cours de l'étape 5) dans le microtube correspondant au même échantillon. Réaliser à nouveau les étapes 4 et 5.

7.3. Extraction d'ADN

La présente méthode a été validée en utilisant le kit d'extraction d'ADN QIAmp® (Qiagen®). Le laboratoire peut choisir d'utiliser un autre kit, 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 que les critères de performance de la méthode globale ainsi modifiée restent au moins équivalents à ceux de la méthode ci-dessous (1 nématode de *B. xylophilus* doit être détecté et la valeur du « Cycle threshold » (Ct) doit être inférieure à 25).

1. Ajouter des billes de verre dans chaque microtube (2 billes de 3 mm et quelques billes de 1 mm de diamètre).
2. Ajouter la solution de tampon de lyse fourni avec le kit d'extraction d'ADN QIAmp® (Qiagen®). Le volume de tampon de lyse à ajouter est celui préconisé par le fournisseur du kit (par exemple, 180 µL de tampon de lyse (ATL) + 20 µL de protéinase K du kit).
3. Remettre en suspension le culot par agitation.
4. Réaliser un broyage par agitation à environ 30 coups par seconde pendant environ 40 secondes.
5. Cet extrait est ensuite traité selon les préconisations du fournisseur du kit d'extraction d'ADN décrites dans le paragraphe concernant les tissus (par exemple, pages 33 à 36 version 11/2007 de la documentation Qiagen® « QIAmp® DNA Mini and Blood Mini Handbook – Second edition »). Le volume final d'élution est de 100 µL.
6. Les solutions d'ADN ainsi obtenues sont ensuite analysées directement par PCR temps réel ou congelées (<-10°C) jusqu'à leur analyse.

7.4. Détection par PCR temps réel

Ce protocole a été évalué et validé en utilisant le pré-mix LightCycler® 480 Probes Master de la société Roche Diagnostics. Le laboratoire peut choisir d'utiliser un autre kit, 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 que les critères de performance de la méthode globale ainsi modifiée restent au moins équivalents à ceux de la présente méthode.

1. Préparation du mélange réactionnel :
   Chaque tube est analysé **en duplicat**. La composition du mélange réactionnel est la suivante :

Réactifs	**Concentration finale** *(volume final par puits : 20 µL)*
Eau Ultra Pure	qsp 15 µL
Tampon de polymérase à ADN ou tampon de pré-mix commercial	1 X*
Chlorure de magnésium	5,5 mM*
Amorce BSatF	0,3 µM
Amorce BSatR	0,3 µM
Sonde BSatS	0,1 µM
Amorce 18S uni-F	0,3 µM
Amorce 18S uni-S	0,3 µM
Sonde 18S uni-P	0,1 µM
dNTPs	200 µM / dNTP*
Taq polymérase	0,025U/µL*

* ou concentration fixée et optimisée par le fournisseur si un pré-mix du commerce est utilisé.

2. Distribution du mélange réactionnel à raison de 15 µL par puits PCR (plaques, microtubes ou autres consommables adaptés au thermocycleur).
3. Ajout de 5 µL de solution d'ADN à tester dans les puits PCR.
4. Amplification
   Le programme d'amplification du thermocycleur est le suivant :

Dénaturation initiale	10 min à 95°C	35 cycles
Dénaturation	15 sec à 95°C	
Hybridation - Elongation	1 min à 60°C*	

* acquisition de la fluorescence en fin d'élongation

8. Résultats

Les résultats obtenus par PCR temps réel sont traités par une analyse automatique du logiciel.

8.1. Validation de l'analyse

a) Validation de l'amplification

L'amplification est validée pour l'organisme cible recherché (test spécifique) lorsque :
- le témoin négatif de PCR (A-) ne donne pas d'amplification ou bien donne une valeur de Ct ≥ 25,
- le témoin positif de PCR (A+) donne une amplification avec une valeur de Ct < 25.

b) Validation de l'extraction d'ADN

L'extraction d'ADN est validée pour l'organisme cible recherché (test spécifique) lorsque :
- le témoin négatif de processus (E-) ne génère pas d'amplification ou montre une amplification avec une valeur de Ct ≥ 25,
- le témoin positif de processus (E+) génère une amplification avec une valeur de Ct < 25.

Dans le cas où les résultats d'un ou plusieurs témoins ne sont pas conformes à ceux attendus (définis ci-dessus), l'analyse n'est pas validée et selon la non-conformité observée, toute ou partie de l'analyse est à refaire.

8.2. Interprétation des résultats

Lorsque la série d'analyses est validée par l'obtention de résultats conformes pour les différents témoins, les résultats des échantillons à analyser peuvent être interprétés de la façon suivante pour l'organisme cible recherché (test spécifique) :

Prise d'essai		**Résultat de la prise d'essai**
Puits 1	**Puits 2**	
+	+	Positif
+	-	PCR à refaire. Si au moins 1 positif sur 2 lors de la deuxième amplification, le résultat est interprété comme positif.
-	-	1/ Si une courbe d'amplification exponentielle avec une valeur de Ct < 30 est observée pour le test universel 18S uni pour la prise d'essai considérée, le résultat pour la prise d'essai considérée est négatif. 2/ Si une courbe d'amplification exponentielle avec une valeur de Ct > 30 ou s'il n'est pas observé d'amplification pour le test 18S uni pour la prise d'essai considérée, refaire la PCR avec la solution d'ADN dilué au 1/10^{e}. Si le résultat de la 2ème PCR est identique à celui de la 1ère PCR, le résultat n'est pas interprétable. Une analyse selon la méthode MOA020 partie B doit être réalisée.

\+ : observation d'une courbe d'amplification exponentielle avec une valeur de Ct < 25 pour le test spécifique *B. xylophilus*.

\- : absence de courbe d'amplification exponentielle ou observation d'une courbe d'amplification exponentielle avec une valeur de Ct ≥ 25 pour le test spécifique *B. xylophilus*.

Remarque : dans le cas où une courbe d'amplification exponentielle est observée et 25 ≤ Ct < 30 pour le test spécifique, le résultat de la prise d'essai considérée est négatif. Toutefois, une confirmation selon la méthode MOA020 partie B sera réalisée.

8.3. Formulation du résultat d'analyse

Le résultat final de l'analyse est exprimé sous forme qualitative de la façon suivante :
« Détection de *B. xylophilus* par PCR temps réel » :
- « **Test négatif »** lorsque le résultat de la prise d'essai est négatif pour l'organisme cible,
- « **Test positif »** lorsque le résultat de la prise d'essai est positif pour l'organisme cible.

Pour tous résultats d'analyse positifs ou négatifs (Ct < 30) pour le test spécifique *B. xylophilus*, il sera fait mention sur le rapport d'analyse que ce résultat doit être confirmé par une analyse réalisée selon la méthode MOA020 partie B.

9. Élimination des matériels susceptibles d'être contaminants

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

10. Conservation des reliquats d'échantillons utilisés

Il n'y a pas d'exigences particulières concernant la conservation des reliquats de matériels utilisés sauf spécifications contraires de la Direction Générale de l'Alimentation au sein du ministère chargé de l'agriculture.
Dans le cas où une analyse de confirmation est nécessaire, l'ADN extrait ainsi que le reliquat d'échantillon de bois sont adressés au laboratoire réalisant l'analyse de confirmation selon la méthode MOA020 partie B.

REMERCIEMENTS

Le Laboratoire de la santé des végétaux remercie l'INRA de Sophia Antipolis pour l'expertise mobilisée lors de la revue de la présente méthode.
Des remerciements sont adressés à l'unité de mycologie ainsi qu'à l'ensemble des agents de l'unité de nématologie pour leur participation active à la correction du document.

LISTE DES DOCUMENTS OFFICIELS APPELES PAR LA METHODE

Référence	Titre
MOA 020 partie B	Détection et identification par analyse morphologique et biomoléculaire du nématode du pin *Bursaphelenchus xylophilus* (bois et écorces de conifères)
MOA 012	Extraction, détection et identification morphobiométrique des nématodes phytoparasites
Directive 2000/29/CE du Conseil du 8 mai 2000	Directive 2000/29/CE du Conseil du 8 mai 2000 concernant les mesures de protection contre l'introduction dans la Communauté d'organismes nuisibles aux végétaux ou aux produits végétaux et contre leur propagation à l'intérieur de la Communauté *Journal officiel n°L 169 du 10/07/2000 p. 0001 – 0 022*
GLO 001	Glossaire des termes techniques en vigueur au LNPV
	Rapport d'évaluation d'outils moléculaires de détection de *Bursaphelenchus xylophilus* sur extrait de bois. Février 2011

BIBLIOGRAPHIE SUCCINCTE

BAERMANN G. (1917) Eine einfache Methode zur Auffindung von Ankylostomum (nematoden) Larven in Erdproben. *Geneesk. Tijschrift Ned-indie* 57, 131-137.

FRANCOIS C., CASTAGNONE C., BOONHAM N., TOMLINSON J., LAWSON R., HOCKLAND S., QUILL J., VIEIRA P., MOTA M., CASTAGNONE-SERENO P. (2007) Satellite DNA as a target for TaqMan real-time PCR detection of the pinewood nematode, *Bursaphelenchus xylophilus*. *Molecular plant pathology* 8(6), 803-809.

IOOS R., FOURRIER C., IANCU G, GORDON TR. (2009) Sensitive detection of *Fusarium circinatum* in pine seed by combining an enrichment procedure with a real-time polymerase chain reaction using dual-labeled probe chemistry. *Phytopathology* 99, 582-590.

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.