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/2011-09-004
MOD10.21 E 01/01/11

NOTE DE SERVICE

DGAL/SDQPV/N2011-8201

Date: 06 septembre 2011

Date de mise en application :	Immédiate
Abroge et remplace :	Méthode DG2/03 version a (avis au JO n°255 du 04/11/2003)
Date d'expiration :	Sans objet
Date limite de réponse/réalisation :	Sans objet
Nombre d'annexe :	1
Degré et période de confidentialité :	Aucune

Objet : Méthodes d'analyse MOA 022 version 1a relative aux techniques qualitatives d'amplification enzymatique des acides nucléiques : PCR (POLYMERASE CHAIN REACTION), RT-PCR (REVERSE TRANSCRIPTION-PCR) et PCR TEMPS REEL. Détection et identification des organismes phytopathogènes.

Références : Article R 202 du code rural, décret 2006-7 du 4 Janvier 2006 relatif aux laboratoires nationaux de référence, ainsi qu'à l'agrément et à la reconnaissance des laboratoires d'analyses dans le domaine de la santé publique vétérinaire et de la protection des végétaux, et modifiant le code rural, arrêté ministériel du 19 décembre 2007 fixant les conditions générales d'agrément des laboratoires d'analyses dans le domaine de la santé publique vétérinaire et de la protection des végétaux

Résumé : Publication de la méthode officielle d'analyse MOA 022 version 1a relative aux techniques qualitatives d'amplification enzymatique des acides nucléiques : PCR (POLYMERASE CHAIN REACTION), RT-PCR (REVERSE TRANSCRIPTION-PCR) et PCR TEMPS REEL. Détection et identification des organismes phytopathogènes » .

Mots-clés : Méthode officielle d'analyse - MOA - analyses - PCR - détection - identification - bactéries - virus - champignons - nématodes - végétaux - méthodes moléculaires - réactifs

Destinataires

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

Même si diverses techniques existent pour la détection et l'identification des organismes nuisibles (sérologiques, isolement sur milieu, identification morphologique,...), la plupart des méthodes actuellement développées dans les différentes disciplines sont basées sur des techniques moléculaires, en particulier la PCR (polymerase chain reaction). Les techniques PCR ou dérivées sont utilisées notamment pour la détection des virus, des nématodes, des champignons, et dans une moindre mesure pour la détection ou l'identification des bactéries et des arthropodes.

Indépendamment des organismes concernés, la mise en œuvre de cette technique dans le cadre d'analyses officielles nécessite de respecter un certain nombre d'exigences générales communes pour permettre d'atteindre les critères de performance attendus des méthodes.

La présente note a pour objet la publication officielle de la méthode générale MOA 022 version 1a relative aux techniques qualitatives d'amplification enzymatique des acides nucléiques (PCR ou POLYMERASE CHAIN REACTION, RT-PCR ou REVERSE TRANSCRIPTION-PCR et PCR TEMPS REEL) pour la détection ou l'identification des organismes phytopathogènes.

Cette méthode officielle s'applique pour toutes les méthodes officielles réalisées à l'aide de cette technique, les dispositions particulières liées aux couples matrice / organismes nuisibles étant précisées dans des méthodes officielles spécifiques.

Remarque : La MOA 022 version 1a remplace la DG2/03 publiée par l'avis au Journal Officiel n°255 du 04/11/2003.

Vous trouverez cette méthode officielle d'analyse MOA 022 version 1a en annexe de cette note de service d'information.

L'adjoint au sous-directeur de la qualité et de la protection des végétaux

Joël FRANCART

METHODE OFFICIELLE D'ANALYSE

TECHNIQUES QUALITATIVES D'AMPLIFICATION ENZYMATIQUE DES ACIDES NUCLEIQUES :

PCR (POLYMERASE CHAIN REACTION) , RT-PCR (REVERSE TRANSCRIPTION-PCR) ET PCR TEMPS REEL

DETECTION ET IDENTIFICATION DES ORGANISMES PHYTOPATHOGENES

Réf. : MOA 022 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.

MOA 008	Consultation publique		Validité	
Numéro de la version	Début	Fin	Début	Fin
DG2/03/version a	-		Septembre 2003	Septembre 2011[1] + 3 mois
MOA 022 version 1a	Avril 2011	Mai 2011	Septembre 2011	

[1] La nouvelle méthode apportant des garanties supplémentaires par rapport à la DG2/03, la validité de cette dernière est ramenée à 4 mois et non 18 (utilisable donc jusqu'au 31/12/2011).

SOMMAIRE

PREAMBULE 6

Objet des méthodes officielles 6
Glossaire, abréviations et documents connexes 6
Limites imposées aux laboratoires agréés ou reconnus 6
Échantillonnage et échantillon 6
Modification des méthodes officielles 6
Considérations d'ordre métrologique 7
Obligations réglementaires et limites de responsabilité 7
Revue des méthodes officielles, amendement et modification 8

ORIGINE DE LA METHODE 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
   3.1. Principes techniques 11
      3.1.1. La PCR conventionnelle (« point final ») 11
      3.1.2. La PCR en temps réel 12
   3.2. Applications 12
4. Produits et consommables 13
   4.1. Préconisations techniques pour les réactifs 13
      4.1.1. Les amorces (= « primers, oligonucléotides ») et sondes (- d'hybridation, FRET, balises moléculaires, scorpions, etc.) 13
      4.1.2. L'ADN polymérase thermostable 13
      4.1.3. La transcriptase inverse 14
      4.1.4. La solution tampon de réaction enzymatique (ADN polymérase) 14
      4.1.5. Le chlorure de magnésium 14
      4.1.6. Les désoxyribonucléosides triphophates (dNTP) 14
      4.1.7. Mélange commercial (MasterMix commercial pour la PCR en temps réel par ex.) 14
      4.1.8. L'eau 14
      4.1.9. Additifs de PCR 15
      4.1.10. Produits chimiques pour la détection des produits PCR (ex. Bromure d'éthidium) 15
   4.2. Contrôles de la qualité des réactifs 15
      4.2.1. Généralités 15

4.2.2. Extraction des ADN ou ARN et kits d'extraction / de purification 15
4.2.3. Validation des amorces 15
4.2.4. Validation des sondes....16
4.2.5. Validation du mastermix, de l'ADN polymérase thermostable, de la transcriptase inverse 16
4.2.6. Validation globale du processus....16

5. Appareillage et matériel, consommables 16
5.1. Petit matériel requis :....16
5.2. Gros matériel requis: 16
5.3. Maintenance et contrôles des appareils....17
5.3.1. Centrifugeuses....17
5.3.2. Micropipettes*....17
5.3.3. Thermocycleurs*....18
5.3.3.1. Dispositifs de régulation de température....18
5.3.3.2. Système optique 18
5.3.4. Appareils pour électrophorèse en gel....18
5.3.4.1. Systèmes de migration 18
5.3.4.2. Systèmes de visualisation....18
5.3.5. Spectrophotomètres, luminomètres, et fluorimètres 18
5.3.6. Autres équipements....18

6. Contrôles et témoins....20
6.1. Définitions....20
6.2. Contrôles et validation des réactifs 20
6.3. Contrôles et témoins pour les analyses 21

7. Etapes de l'analyse....22
7.1. Réception des échantillons. 22
7.2. Préparation des échantillons et prises d'essai 22
7.3. Extraction et purification des ADN ou ARN 22
7.4. Réplicats d'analyse....22
7.5. Mélange réactionnel 23
7.6. Amplification 23
7.7. Caractérisation des amplicons en point final....23
7.7.1. Par poids moléculaire....23
7.7.1.1. La migration sur gel 23
7.7.1.2. La révélation....24
7.7.2. Par séquençage 24
7.7.3. Par profil de restriction....24
7.7.4. Par hybridation 24
7.8. Caractérisation des amplicons en PCR en temps réel 24

8. Résultats 26
8.1. Vérification de l'interprétabilité des résultats 26
8.2. Interprétation et formulation des résultats....28

9. Elimination des matériels susceptibles d'être contaminants 29

10. Conservation des reliquats de matériels utilisés....29

LISTE DES DOCUMENTS OFFICIELS APPELES PAR LA METHODE 30

BIBLIOGRAPHIE SUCCINCTE 31

ANNEXE I – Tableau de correspondance 33

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 ou ARN 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. Les erreurs maximales tolérées (EMT) à prendre en considération sont données dans le tableau ci-après (dans le cas contraire, les 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

La présente méthode a été élaborée par l'ensemble des unités du Laboratoire de la santé des végétaux.
Le travail de relecture et de révision a été effectué par l'unité « Développement de méthodes et analyses » du Laboratoire de la santé des végétaux.

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.

Les modifications et améliorations s'entendent par rapport à l'ancienne méthode officielle DG2/03 version a. La présente méthode a été élaborée en intégrant les principes définis par la norme XP V03-043 tout en l'adaptant aux besoins des méthodes officielles de détection / identification des organismes nuisibles et ravageurs des végétaux.
Une table de correspondance entre la DG2/03 version a et la présente méthode est donnée en annexe 1.

MODIFICATIONS

- modalités de contrôle de la qualité des réactifs critiques ;
- contrôles et témoins nécessaires pour les analyses ;
- qualification du matériel ;
- rajout de la PCR en temps réel.

AMELIORATIONS

- mise en forme de la méthode et modification du préambule selon un schéma harmonisé commun à l'ensemble des nouvelles méthodes ;
- retrait des définitions de ce document pour les intégrer dans le glossaire général (MOA GLO 001).

Nota bene: les améliorations de pure forme ne sont pas reprises dans cette synthèse des modifications.

DESCRIPTION DE LA METHODE

1. Objet.

La présente méthode fixe les principes généraux de réalisation des analyses de dépistage ou d'identification des organismes nuisibles pour les végétaux à l'aide de la technique PCR et des techniques apparentées.
Les méthodes officielles spécifiques par couple matrice / organisme nuisible ou, à défaut, les fournisseurs de réactifs, fixent les exigences spécifiques complémentaires à mettre en œuvre pour la réalisation pratique des analyses, notamment :

- la nature et la préparation de l'échantillon pour analyse ;
- la nature et les modalités de réalisation de la prise d'analyse ;
- les modalités d'extraction et de purification des ADN OU ARN (fragmentation, broyage, macération, ...) ;
- la composition du mix et le programme d'amplification ;
- les modes de conservation du matériel végétal et de l'extrait.

Des consignes particulières peuvent également fixer les conditions ou éléments pouvant influer sur la qualité des résultats :

- l'ambiance générale des locaux (température, propreté, …),
- le "savoir faire" (pipetage, manipulation des plaques, qualité du gel d'agarose pour la PCR conventionnelle, appareil de capture d'image sur les gels,…),
- les seuils choisis pour l'interprétation et le bruit de fond (PCR temps réel).

Dans tous les cas, en cas de prescriptions techniques différant entre sources, il est demandé aux laboratoires d'appliquer, par ordre de priorité : les méthodes officielles spécifiques, les méthodes officielles générales ou, en l'absence d'autres éléments, les prescriptions des fournisseurs. En cas de doute, le laboratoire peut toujours solliciter l'avis du laboratoire national de référence correspondant à la ligne d'analyse concernée.

2. Domaine d'application.

Objets susceptibles d'être soumis à analyse.

Toutes les analyses de dépistage des organismes pathogènes pour les végétaux faisant appel à la technique PCR, RT-PCR ou PCR temps réel sont concernées par la présente méthode. Les méthodes IC-PCR (immunocapture) et IC-RT-PCR sont couvertes par la présente méthode en ce qui concerne les aspects « PCR ». Les phases amont (sérologiques) ne sont pas couvertes par la présente méthode. Au besoin, se référer aux dispositions adaptées des MOA 008 ou MOA 010.

Limitations relatives aux objets susceptibles d'être soumis à analyse

Les particularités des objets soumis à essais (nature, stade physiologique,…) et la taille des échantillons sont définies dans les notes de services publiées par le ministère chargé de l'agriculture ou dans les méthodes officielles spécifiques. Les spécifications techniques relatives à l'analyse proprement dite sont précisées dans les méthodes officielles spécifiques par couple matrice/organisme nuisible.

Grandeur de l'objet soumis à analyse.

Les objets soumis à analyse (matrices, quantités,…) sont définis dans les méthodes officielles spécifiques des couples hôtes / organismes nuisibles.

Précaution(s) particulière(s) à prendre.

* Les délais maximum entre la réception de l'échantillon et le début effectif de l'analyse sont définis dans les méthodes officielles spécifiques et/ou dans les notes de services publiées par le ministère chargé de l'agriculture.

* La température et autres conditions de conservation des échantillons sont définies dans les méthodes officielles spécifiques voire dans les notes de services publiées par le ministère chargé de l'agriculture.

* L'agencement des zones de travail au sein du laboratoire doit dans toute la mesure du possible suivre le principe de la « marche en avant ». De manière générale, il est recommandé d'utiliser des zones séparées pour les différentes étapes (préparation des échantillons, extraction des acides nucléiques,…).
Il est toutefois obligatoire de réserver des zones spécifiques :

- pour la préparation du milieu réactionnel (une très faible quantité d'amplicons contaminant ce milieu serait amplifiée au cours de la PCR) ;
- pour les opérations *post* amplification (présence d'amplicons en très grande quantité).

Ces zones doivent être isolées de l'ensemble des autres zones de façon à éviter tout risque de contamination.

* Le laboratoire mettra en place des procédures pour éviter les contaminations via :
  - le personnel (port de gants à usage unique, blouses dédiées,…) ;
  - le matériel (recours à des cônes à filtre requis pour certaines étapes par exemple) ;
  - les déchets (évacuation régulière et adaptée,…).

***** En cas d'utilisation**,** une zone délimitée doit être dédiée à la manipulation exclusive du BET (Bromure d'éthidium) ou autres produits intercalants mutagènes.

3. Présentation schématique de la détection

La présente méthode rappelle quelques exigences générales concernant les réactifs et les consommables, le matériel, les contrôles et témoins. Elle présente ensuite les prescriptions techniques à respecter et appelle l'attention des utilisateurs sur quelques points clé pour chacune des étapes constitutives de la technique PCR (et apparentées).

3.1. Principes techniques

3.1.1. La PCR conventionnelle (« point final »)

Le principe de la PCR repose sur l'amplification de séquences cibles d'acides nucléiques par synthèse de brins d'ADN réalisée par une enzyme de réplication (l'ADN polymérase ADN dépendante thermostable), à partir d'amorces complémentaires et de bases d'acide désoxyrobonucléique en présence de co-facteurs.
Plusieurs cycles constitués de plusieurs étapes se font suite :

- dénaturation, en général par augmentation de la température (séparation des brins d'ADN) ;
- Hybridation des amorces ;
- Synthèse de brins complémentaires dans le sens 5'-> 3'.

La répétition de ces cycles permet l'amplification exponentielle du fragment d'ADN délimité par les zones d'appariement des amorces (amplicon).

La technique d'amplification génomique à partir d'un ARN est possible en incluant une étape permettant la transcription de l'ARN en ADN par une enzyme, la transcriptase inverse (ADN polymérase ARN dépendante). Cet ADN peut être amplifié par PCR exactement comme décrit plus haut. Cette variante est nommée RT-PCR (Reverse Transcription-Polymerase Chain Reaction).

Après amplification, les amplicons peuvent être caractérisés (identifiés), grâce à leurs propriétés de poids moléculaire ou leur profil de restriction ou bien grâce aux méthodes de séquençage et d''hybridation

moléculaire, etc... Cette caractérisation permet de s'assurer que les amplicons correspondent bien au fragment « attendu » défini par les zones d'appariement des deux amorces.

3.1.2. La PCR en temps réel

La PCR en temps réel repose sur le même principe que la PCR conventionnelle en ce qui concerne l'amplification, mais se distingue par le fait que la mise en évidence des amplicons s'effectue non pas à la fin de la réaction mais en cours de synthèse : à chaque cycle d'amplification, la quantité d'ADN total ou d'amplicons est mesurée grâce à un marqueur fluorescent. Pour cela, diverses technologies sont possibles :

- Utilisation de marqueurs fluorescent spécifiques : sondes d'hydrolyse (e.g. sondes TaqMan®, dual-labelled probes, etc.), sondes d'hybridations, les sondes scorpions, etc.
- Utilisation de marqueurs fluorescents aspécifiques intercalants de l'ADN : SybrGreen , HRM dye, etc.;

*Remarque*s :

- le principe de passer par une phase de transcription inverse est également possible pour la PCR temps réel. Il s'agit dans ce cas d'une RT-PCR en temps réel.
- Ne pas confondre RT-PCR (reverse transcription PCR) et rt-PCR (real time PCR) ;
- La PCR temps réel est également appelée « qPCR » de par sa faculté à être utilisée pour des quantifications dès lors qu'une gamme de référence est utilisée. Ce terme ne sera pas retenu ici, seules les applications en qualitatif étant couvertes par la présente méthode.

3.2. Applications

La technique PCR permet de détecter et d'amplifier à l'aide d'oligonucléotides (amorces) spécifiques des séquences ciblées d'un génome. Ces techniques sont donc largement utilisées pour la détection ou l'identification des organismes phytopathogènes ou ravageurs. Elle peut s'appliquer à toutes les disciplines dès lors que des acides nucléiques peuvent être extraits et de qualité suffisante pour pouvoir être amplifiés.

De par leur grande sensibilité, ces techniques doivent être accompagnées de précautions particulières pour éviter tout risque de contamination se traduisant par l'apparition de « faux positifs ». La principale source de contamination est le produit d'amplification lui même pouvant contaminer l'air (aérosol) et/ou le matériel utilisé. Des exigences particulières concernant la préparation du milieu réactionnel très sensible à ces contaminations, sont spécifiées dans cette méthode officielle (voir point 2 précautions particulières ainsi que les détails donnés pour chacune des étapes au point 7).

4. Produits et consommables

En règle générale, le manipulateur doit veiller à l'absence dans l'eau, produits et consommables utilisés, de contamination, d'inhibiteur ou de tout autre élément pouvant interférer sur le résultat par l'utilisation de produits et consommables adaptés et le cas échéant par leur nettoyage / stérilisation ou tout autre traitement approprié. Les réactifs utilisés doivent être de qualité analytique et adaptés à des applications de biologie moléculaire.

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 de conservation les plus adaptées. Le laboratoire doit dans tous les cas prendre en compte les dates de péremption préconisées par les fabricants lorsqu'une telle date est fournie. L'utilisation ponctuelle de réactifs après la date limite d'utilisation stipulée par le fournisseur doit pouvoir être étayée par des essais ou des contrôles (témoin calibré ou témoin en limite de détection par exemple) montrant l'absence de conséquences sur la qualité des essais.

Attention : En cas d'utilisation de produits toxiques, les conditions de sécurité pour le personnel et l'environnement doivent être appliquées pour la conservation, la manipulation, et le traitement des déchets (voir également paragraphe 2 « précautions particulières »).

4.1. Préconisations techniques pour les réactifs

4.1.1. Les amorces (= « primers, oligonucléotides ») et sondes (- d'hybridation, FRET, balises moléculaires, scorpions, etc.)

Les méthodes officielles spécifiques par couple hôte / organisme nuisible définissent :

- la séquence des amorces à utiliser ;
- la séquence des sondes à utiliser et, dans certains cas, les fluorophores et les quenchers.

Les amorces et sondes achetées par les laboratoires pour la réalisation des analyses officielles doivent être de qualité (purification) suffisante pour permettre des réactions optimales.
Sauf si elles le sont déjà, les amorces et sondes sont réhydratées à réception ou avant utilisation. Elles sont conservées congelées à une température inférieure à –18°C. Les sondes seront également conservées à l'abri de la lumière lors de leur utilisation (occulter les tubes de solutions à l'aide d'une feuille de papier aluminium par exemple)
Afin de s'assurer de la stabilité des solutions d'amorces et de sondes réhydratées il est préconisé de fixer un délai d'utilisation maximum après ouverture ou un nombre maximal de cycles de congélation / décongélation. Pour ce faire, des fractions aliquotes suffisamment petites des solutions de travail peuvent par exemple être préparées.

Lorsque la polymérase utilisée n'est pas « hot start », lors de leur utilisation, il est préférable de conserver les amorces et sondes sur glace ou tout autre moyen réfrigérant.

4.1.2. L'ADN polymérase thermostable

Il s'agit d'une enzyme ou d'un mélange d'enzymes utilisé(e) pour la réaction de polymérisation d'ADN *in vitro*. La ou les marque(s) de polymérase(s) avec la(les)quelle(s) la méthode a été validée figure(nt) généralement dans les méthodes spécifiques hôte / organisme nuisible.

Elle est conservée conformément aux préconisations du fournisseur, en règle générale congelée à une température inférieure à –18°C.
Lors de son utilisation, lorsqu'il ne s'agit pas d'une polymérase « hot start », il est préférable de la conserver sur glace ou tout autre moyen réfrigérant.

4.1.3. La transcriptase inverse

Il s'agit d'une enzyme ou d'un mélange d'enzymes utilisé(e) pour la réaction de transcription de l'ARN en ADN *in vitro*. La ou les marque(s) de transcriptase inverse(s) avec la(les)quelle(s) la méthode a été validée figure(nt) généralement dans les méthodes spécifiques hôte / organisme nuisible.

Elle est conservée congelée à une température inférieure à –18°C. Lors de son utilisation, il est préférable de la conserver sur glace ou tout autre moyen réfrigérant sauf préconisations contraires du fournisseur.

4.1.4. La solution tampon de réaction enzymatique (ADN polymérase)

Il convient d'utiliser le tampon de réaction fourni avec l'enzyme. Il est conservé au congélateur. Une décongélation complète ainsi qu'une homogénéisation par vortex doivent être réalisées avant toute utilisation.
A chaque changement de tube de polymérase, il convient d'utiliser le nouveau tube de solution tampon fourni et de jeter l'ancien. A défaut, le laboratoire devra mettre en place des mesures de prévention des contaminations.

4.1.5. Le chlorure de magnésium

Une qualité suffisante pour une application en biologie moléculaire est requise. Il est conseillé d'utiliser la solution fournie par le fournisseur de polymérase à ADN. Une décongélation complète ainsi qu'une homogénéisation par vortex doivent être réalisées avant toute utilisation.
A chaque changement de tube de polymérase, il convient d'utiliser le nouveau tube de solution de magnésium fourni et de jeter l'ancien.

4.1.6. Les désoxyribonucléosides triphophates (dNTP)

Des solutions contenant les désoxyribonucléosides triphophates dATP, dCTP, dGTP, dTTP et/ou dUTP, selon le cas, de qualité requise pour la biologie moléculaire doivent être utilisées. Elles sont conservées au congélateur. Afin de s'assurer de la stabilité des solutions, des fractions aliquotes suffisamment petites doivent être préparées afin d'éviter de trop nombreux cycles de congélation/décongélation.
A défaut d'une date limite d'utilisation préconisée par le fournisseur, les solutions aliquotes sont utilisables tant que les manipulations de PCR sont validées par les différents contrôles.

4.1.7. Mélange commercial (MasterMix commercial pour la PCR en temps réel par ex.)

Selon leur provenance, certains des composants listés plus haut peuvent être déjà mélangés dans le tampon de réaction concentré. Ce mélange est généralement conservé au congélateur mais certaines références sont stockées au froid positif (se référer aux prescriptions du fournisseur).
Lors de son utilisation, il est préférable de le conserver sur glace ou tout autre moyen réfrigérant sauf préconisations contraires du fournisseur. Il est utilisable tant que les manipulations de PCR sont validées par les différents contrôles, sauf lorsqu'une date de péremption spécifiée par le fabricant est indiquée, auquel cas il faudra la respecter.

4.1.8. L'eau

L'eau requise doit être 'ultrapure', pour être de qualité compatible avec les méthodes de biologie moléculaire utilisées. Pour cela, elle sera i) produite par un ultra purificateur d'eau pour lequel une procédure appropriée de maintenance est suivie ou ii) achetée dans le commerce.
Elle est considérée de qualité suffisante (absence d'activité nucléasique, absence d'effet inhibiteur de PCR et absence d'acide nucléique détectable) lorsque tous les contrôles de performance de PCR réagissent favorablement (contrôles *ad hoc*, cf. § 6) lors de chaque série d'analyses.

4.1.9. Additifs de PCR

Il s'agit de substances telles que le polyéthylèneglycol ou l'albumine de sérum bovin (BSA) qui doivent être ajoutées aux réactifs de PCR lorsque requis par la méthode afin d'augmenter l'efficacité de la réaction. Ces additifs sont préparés et conservés selon les recommandations du fournisseur.

4.1.10. Produits chimiques pour la détection des produits PCR (ex. Bromure d'éthidium)

Ces produits chimiques (Bromure d'éthidium, SyBrGreen ou molécules assimilées) sont conservés en solution mère conformément aux recommandations des fournisseurs.

4.2. Contrôles de la qualité des réactifs

4.2.1. Généralités

Pour chaque lot de réactifs et de consommables critiques listés ci-après, les certificats d'analyse et / ou de contrôle qualité des fournisseurs doivent, s'ils sont disponibles, être demandés et archivés. L'ouverture de nouveaux lots de réactifs critiques doit être enregistrée et pour chaque PCR les numéros de lots des différents réactifs utilisés doivent être tracés.

Le laboratoire doit également vérifier la qualité des réactifs critiques (voir ci-après) dans le processus analytique complet et doit décrire les modalités de contrôle :

- soit avant leur utilisation ; dans ce cas, en règle générale, les nouveaux lots de réactifs et ou de consommables seront contrôlés par comparaison avec les anciens lots utilisés (paragraphes 4.2.2 à 4.2.5.) ;
- soit par un suivi global *a posteriori*. Dans ce cas l'utilisation de témoins appropriés permettra de contrôler les nouveaux lots utilisés (voir paragraphe 4.2.6).

Les témoins et contrôles permettent également de faire un suivi de la qualité des réactifs au cours de leur période d'utilisation.

4.2.2. Extraction des ADN ou ARN et kits d'extraction / de purification

L'extraction des ADN ou ARN est une étape critique dans les analyses de détection d'organismes nuisibles phytopathogènes tant dans la quantité d'ADN ou ARN extraite que dans la qualité de ces derniers.
Les changements apportés à la technique ou au kit d'extraction / de purification préconisés dans la méthode officielle sont assujettis aux dispositions du paragraphe « modification des méthodes officielles » du préambule.

Lors de changement de réactif fabriqué au sein du laboratoire nécessaire à l'extraction (ex : CTAB, RNase,…) ou lors de l'ouverture d'un nouveau lot de kit commercial d'extraction, le laboratoire doit s'assurer qu'au final la qualité de l'extraction n'a pas été altérée par l'utilisation de témoins appropriés.

Exemples :

- extraction d'un témoin positif de processus (si possible en limite de détection) en double l'un avec l'ancien lot l'autre avec le nouveau et en vérifiant après amplification que l'ADN ou ARN extrait était en quantité et de qualité suffisantes ;
- détermination de la quantité d'ADN ou ARN totale extraite (par exemple à l'aide d'un spectrophotomètre) et en comparant la quantité obtenue avec le nouveau lot de réactif à celle habituellement obtenue…

4.2.3. Validation des amorces

La séquence des amorces est définie par les méthodes officielles. Le laboratoire utilisateur n'a pas à re-contrôler la sensibilité ni la spécificité des amorces, même en cas de changement de lot ou de

fournisseur. En revanche, des erreurs de fabrication pouvant survenir, le laboratoire doit vérifier lors de la première utilisation du nouveau lot que les témoins positifs (en particulier le témoin en limite de détection lorsque ce dernier est mis en œuvre / disponible) et négatif(s) d'amplification donnent les résultats attendus. Au besoin, les contrôles peuvent également se faire sur des gammes de dilution de la cible.

Remarque : ce contrôle limité à la bonne réponse des témoins de processus ne permet pas de détecter les éventuelles erreurs de synthèse en 5', la polymérisation pouvant se faire malgré quelques mis-appariements. Le séquençage occasionnel d'amorces livrées peut être un moyen de vérifier la séquence des amorces et d'évaluer les fournisseurs.

4.2.4. Validation des sondes

La séquence des sondes est définie par les méthodes officielles spécifiques par couple matrice / organisme nuisible. Pour le contrôle de la qualité des sondes, le laboratoire utilisateur doit également vérifier lors de la première utilisation du nouveau lot que les témoins positifs (en particulier le témoin en limite de détection lorsque ce dernier est mis en œuvre / disponible) et négatif(s) d'amplification donnent les résultats attendus.

4.2.5. Validation du mastermix, de l'ADN polymérase thermostable, de la transcriptase inverse

Lorsque le laboratoire achète un nouveau lot de mastermix commercial (dont la composition exacte n'est pas toujours connue), de polymérase thermostable ou de transcriptase inverse, il doit vérifier lors de la première utilisation du nouveau lot que les témoins positifs (en particulier le témoin en limite de détection lorsque ce dernier est mis en œuvre / disponible) et négatif(s) d'amplification donnent les résultats attendus.

4.2.6. Validation globale du processus

L'utilisation pertinente et selon une fréquence adaptée des contrôles présentés au paragraphe « contrôles et témoins » permet de valider *a posteriori* les résultats d'une série d'analyses par PCR. Leur utilisation permet au laboratoire de s'affranchir d'une série de contrôles de validation de consommables et réactifs entrant dans la composition des mélanges réactionnels d'extraction et d'amplification individuellement. Ils permettent de plus de vérifier que l'opérateur a correctement suivi le protocole.

5. Appareillage et matériel, consommables

En règle générale, sauf spécification contraire, le manipulateur doit veiller à l'absence d'acides nucléiques, de nucléases, d'inhibiteurs ou tout autre élément pouvant interférer sur le résultat des analyses (par des nettoyages, stérilisations, ou tout autre traitement approprié) sur tout le matériel utilisé.

Il est recommandé de choisir du matériel dont les parties pouvant être souillées puissent être facilement nettoyées et décontaminées.

5.1. Petit matériel requis :

Le petit matériel classiquement requis pour effectuer l'analyse d'un échantillon végétal par PCR est :

- système de pipetage (pipettes monocanal et multicanaux avec cônes correspondants) garantissant l'absence de contamination entre les solutions pipetées.
- petite verrerie ;
- portoirs, etc…

5.2. Gros matériel requis:

Le gros matériel classiquement requis pour effectuer l'analyse d'un échantillon par PCR est (liste non exhaustive)

- balance(s) ;

- agitateur de type Vortex®
- support centrifuge pour plaques (96 puits) ;
- réfrigérateur / chambre froide ;
- congélateur ;
- broyeur de tissus végétaux dont le fonctionnement permet d'assurer l'absence de contamination entre échantillons ou autres systèmes si les échantillons traités ne sont pas des végétaux ;
- thermocycleur pour PCR point final ou temps réel
- bain marie ou bain à sec
- système de visualisation et d'enregistrement du produit amplifié.
- Sorbonne pour la préparation du milieu réactionnel, salle dédiée ou équivalent
- centrifugeuse
- enceinte climatique pour incubation RFLP

5.3. Maintenance et contrôles des appareils

Le laboratoire doit mettre en œuvre un programme de maintenance et de vérification de conformité aux exigences métrologiques identifiées pour les équipements utilisés au cours du processus analytique de PCR, afin de garantir un niveau de performance adapté.
Le laboratoire doit également assurer que ses équipements sont nettoyés, entretenus et utilisés conformément aux procédures du laboratoire ou aux recommandations des fournisseurs.
Les appareils considérés comme critiques dans la mise en œuvre d'une analyse PCR sont signalés par un astérisque.

5.3.1. Centrifugeuses

La conformité de ces appareils par rapport aux consignes peut être vérifiée de plusieurs approches, par exemple :

- par l'utilisation d'un contrôle positif de processus dans chaque série d'analyses ;
- par l'extraction occasionnelle d'échantillons positifs sur des matrices similaires et des organismes similaires ayant abouti à l'obtention d'un résultat positif ;
- par l'utilisation d'un contrôle interne d'extraction d'ADN (TIA)
- par un contrôle métrologique

5.3.2. Micropipettes*

A minima, un jeu de pipettes sera obligatoirement et uniquement dédié à la préparation du mix et un autre jeu de pipette sera obligatoirement et uniquement dédié aux manipulations d'ADN post-PCR.

A l'exception de celles utilisées à des étapes où le volume n'est pas critique (ex : dépôt en électrophorèse), les micropipettes à volume fixe ou à volume variable doivent être vérifiées (au minimum sur la gamme de volumes réellement utilisés) selon une procédure adaptée aux besoins du laboratoire permettant un raccordement des volumes délivrés au système international et en fonction des différentes étapes analytiques au cours desquelles elles sont utilisées. Chaque micropipette doit néanmoins faire l'objet d'une vérification complète *a minima* une fois par an.

Les automates de pipetage sont soumis aux mêmes exigences que les micropipettes dès lors que les contrôles peuvent être mis en œuvre. De plus, lorsque ces automates n'utilisent pas des embouts jetables, le laboratoire doit apporter la preuve que ces appareils ne causent pas de contamination croisée liée aux opérations de pipetage (y compris celles du prélèvement initial).

A défaut de respecter les indications précitées, le laboratoire précisera les modalités selon lesquelles il assure la justesse, la répétabilité des volumes prélevés ou l'absence d'incidence sur la qualité du résultat final.

5.3.3. Thermocycleurs*

Les dispositions mises en place par le laboratoire doivent permettre de vérifier les performances des dispositifs de régulation de la température ainsi que d'assurer une maintenance appropriée du système optique, lorsqu'il existe.

5.3.3.1. Dispositifs de régulation de température

Le laboratoire doit, *a minima* une fois par an, s'assurer de l'homogénéité du bloc thermorégulé sur la totalité ou un échantillon représentatif de puits ou capillaires et de cycles.

Les tests biologiques seront effectués à l'aide de témoins adaptés. Ils se feront à des concentrations proches de la limite de détection lorsqu'elle est connue ou à des concentrations en cible faibles.
Remarque : Lorsque plusieurs cibles font appel à un même programme d'amplification, les tests précités n'ont pas besoin d'être refaits.

La justesse et l'homogénéité du bloc thermorégulé peuvent également être vérifiées métrologiquement.

5.3.3.2. Système optique

Les appareils de PCR temps réel sont pourvus d'un système optique d'émission et de détection de lumière émise lors de la fluorescence de molécules spécifiques pour suivre le déroulement de l'amplification d'ADN au cours des cycles de PCR, ou sa dissociation lors de la réalisation de courbes de fusion.
Ces appareils doivent faire l'objet d'une maintenance régulière selon les recommandations du constructeur.

5.3.4. Appareils pour électrophorèse en gel

5.3.4.1. Systèmes de migration

Les cuves d'électrophorèse, générateurs, voltmètres doivent être maintenus en parfait état de fonctionnement et de propreté.

5.3.4.2. Systèmes de visualisation

Le laboratoire doit respecter les recommandations sur la durée de vie fournies par le fabricant. Les lampes UV peuvent être utilisées tant que l'intensité des marqueurs de taille et des témoins positifs reste conforme pour permettre la validation de la qualité des résultats.

Lorsque le laboratoire utilise des systèmes de migration et de lecture de gel haut débit, il s'assure que leur emploi se fait conformément aux spécifications du fournisseur et aux besoins qu'il a identifiés.

5.3.5. Spectrophotomètres, luminomètres, et fluorimètres

Spectrophotomètres, luminomètres, et fluorimètres sont parfois utilisés dans les méthodes PCR pour mesurer des concentrations. Lorsque c'est le cas, ces appareils doivent faire l'objet d'une maintenance régulière selon les recommandations du constructeur.

5.3.6. Autres équipements

Les appareils utilisés aux étapes pré et post PCR (incubateurs, bain d'eau, blocs chauffants) doivent être régulièrement cartographiés. Les écarts *maxima* tolérés doivent correspondre aux exigences des méthodes pour lesquelles ils sont utilisés.
Les congélateurs et réfrigérateurs sont cartographiés au minimum à leur mise en service.

Des dispositifs de surveillance de la température doivent être placés dans chaque équipement pour lequel la température est un point critique dans la méthode utilisée. En particulier, le laboratoire doit pouvoir justifier de la conservation des réactifs critiques aux températures cibles.

6. Contrôles et témoins

Il est obligatoire d'intégrer des contrôles à chaque série d'analyses.

6.1. Définitions

La liste des contrôles possibles, leur nature et les informations qu'ils apportent sont récapitulées dans le tableau 1 ci-après (voir MOA GLO 001 pour les définitions) :

Contrôles	Nature du contrôle	Etape d'introduction du contrôle	Contrôle des réactifs (1)	Contrôle opérateur / Matériels	Contrôle contamination
Contrôle positif de processus	Matrice (ou à défaut eau) contenant l'organisme cible ou avec l'acide nucléique cible	Préparation de l'échantillon pour essai	Contrôle de la qualité et performance des réactifs d'extraction	Contrôle de la qualité de la manipulation et du bon fonctionnement matériel	
Contrôle négatif de processus	Matrice ou eau ne contenant pas l'acide nucléique cible	Préparation de l'échantillon pour essai		Contrôle de la qualité de la manipulation	Contrôle d'absence de contamination sur l'ensemble du processus
Contrôle positif d'extraction (et témoin interne d'amplification))	test spécifique de plante ou universel plante ou universel eucaryote	Amplification PCR / préparation de l'échantillon pour essai	Contrôle de la qualité et performance des réactifs d'extraction	Contrôle de la qualité de la manipulation et du bon fonctionnement matériel	
Contrôle positif de PCR	Solution d'acide nucléique cible (génomique ou cible clonée)	Amplification PCR	Contrôle de la qualité et performance des réactifs de PCR	Contrôle de la qualité de la manipulation Contrôle du bon fonctionnement matériel	
Contrôle positif de PCR en limite de détection	Solution d'acide nucléique cible (génomique ou cible clonée)	Amplification PCR	Contrôle de la qualité et performance optimales des réactifs de PCR	Contrôle de la qualité de la manipulation et du bon fonctionnement matériel	
Contrôle négatif de PCR	Mix ne contenant pas l'acide nucléique cible remplacé par de l'eau UP	Amplification PCR			Contrôle d'absence de contamination sur des réactifs
Témoins d'inhibition	Echantillons testés à différentes concentrations ou contrôle positif d'extraction,	Amplification PCR			
Contrôle de spécificité	Solution d'acides nucléiques non cibles reconnues comme susceptibles de générer des résultats faussement positifs si les conditions de stringences ne sont pas optimales	Amplification PCR	Contrôle des concentrations des produits déterminant la spécificité de la PCR	Contrôle de la qualité de la manipulation et du bon fonctionnement matériel (thermocycleur)	

Tableau 1 : Liste et nature des témoins ; étape d'introduction

(1) voir 6.2

6.2. Contrôles et validation des réactifs

Comme évoqué au point 6.1, certains témoins précités permettent donc de contrôler la qualité de certains réactifs critiques. Le tableau 2 ci-dessous définit les conditions selon lesquelles ils permettent de satisfaire aux dispositions du point 4.2.6 « validation globale du processus ».

Type de contrôle[2]	Contrôle des réactifs	Utilisation	Permet de s'affranchir	Commentaires
Contrôle positif de processus	Contrôle de la qualité et performance des réactifs d'extraction	Lorsqu'un nouveau lot de réactif est utilisé à l'étape extraction		Vise à vérifier, lorsqu'il est positif, que la cible présente dans la matrice est bien extraite et amplifiée, mais ne donne pas d'indication sur la quantité d'ADN ou ARN extraite et amplifiée (1)
Contrôle positif de processus proche de la limite de détection		Lorsqu'un nouveau lot de réactif est utilisé à l'étape extraction	Des vérifications liées à la quantité et la qualité de l'ADN ou ARN extrait	Permet de vérifier que la cible présente dans la matrice est bien extraite et amplifiée et qu'il n'y a pas d'inhibitions ni d'impact lié au changement de réactif
Contrôle positif d'extraction (et témoin interne d'amplification))	Idem que le contrôle positif de processus			
Contrôle positif de PCR	Contrôle de la qualité et performance des réactifs de PCR	Systématique		Permet de vérifier que la cible présente dans l'extrait est bien amplifiée, mais ne donne pas d'indication sur son caractère optimal (1) sauf en temps réel pour des témoins standards (comparaison de Ct)
Contrôle positif de PCR en limite de détection	Contrôle de la qualité et performance des réactifs de PCR	Lorsqu'un nouveau lot de réactif est utilisé à l'étape amplification	Des vérifications individuelles des sondes, amorces, mastermix, et autres constituants	Permet de vérifier que la cible présente dans l'extrait est bien amplifiée et sur son caractère optimal

Tableau 2 : validation des réactifs par les contrôles introduits dans les runs
(1) : sauf témoin calibré / point de contrôle.

6.3. Contrôles et témoins pour les analyses

Les témoins à utiliser à chaque série d'analyses parmi ceux donnés dans le tableau 1 sont définis dans les méthodes officielles spécifiques par couple hôte / organisme nuisible. En particulier, la connaissance d'inhibitions possibles (et donc la nécessité d'introduire un témoin d'inhibition) ou de problèmes potentiels de spécificité (et donc la nécessité d'introduire un témoin de spécificité) y seraient signalés.

En tout état de cause, pour chaque série d'analyse, il sera introduit *a minima* et sauf dispositions contraires dans les méthodes officielles:

- un témoin positif validant l'amplification : témoin positif d'amplification ou d'extraction (1 puits au minimum, 2 recommandés[3]) ;
- un témoin négatif d'amplification (1 puits PCR au minimum, 2 recommandés) ;
- un témoin négatif de processus ou un témoin négatif d'extraction (1 ou 2 puits PCR)

En outre, l'introduction d'un témoin positif de processus ou d'un témoin d'extraction excédentaire ou d'un témoin en limite de détection (1 ou 2 puits PCR), est fortement recommandée lorsque le matériel nécessaire est disponible commercialement ou auprès du laboratoire national de référence.

[2] Voir paragraphe 6 pour la nature, l'étape d'introduction, la fréquence d'utilisation,…
[3] Pour l'amplification et la révélation

7. Etapes de l'analyse

L'analyse consiste le plus souvent à mettre en évidence par amplification la présence de matériel génétique d'un agent pathogène / un ravageur donné dans l'extrait d'un échantillon à l'aide d'amorces spécifiques de cet organisme nuisible / ce ravageur.

En général, l'analyse nécessite trois phases distinctes :

- L'obtention (préparation des échantillons et/ou d'extraction et/ou purification) de l'extrait d'acides nucléiques sur lequel est réalisée la prise d'analyse déposée dans le milieu réactionnel.
- L'amplification (PCR, RT-PCR) dans les conditions permettant l'amplification du fragment d'ADN déterminé si celui-ci est présent dans l'extrait.
- La révélation et l'identification des amplicons permettant l'interprétation du résultat (validation et détermination du statut de l'échantillon).

Comme pour tout autre type d'analyse, une traçabilité des opérations doit être assurée.

7.1. Réception des échantillons.

La nature, les conditions d'acceptabilité et les précautions à prendre avant la mise en analyse sont décrites dans les méthodes officielles spécifiques par couple matrice / organisme nuisible.

7.2. Préparation des échantillons et prises d'essai

Le mode opératoire est décrit dans chacune des méthodes spécifiques par couple hôte / organisme nuisible.

Les conditions de prise d'essai sont précisées dans les méthodes spécifiques par couple hôte/organisme nuisible. Deux prises d'essai peuvent parfois être préconisées, en cas de détection sur échantillons asymptomatiques.

Le broyage des échantillons et la (les) prise(s) d'essai doivent s'effectuer conformément à chaque méthode. Les échantillons pulvérulents ou devenant pulvérulents à l'issu du broyage devront être manipulés dans une zone séparée du reste du process d'extraction, et de façon à limiter le plus possible les contaminations (ex ouverture des bols de broyage et prélèvement des prises d'essai sous PSM). Les systèmes de broyage utilisés empêcheront toute contamination croisée entre échantillons (série de bols de broyage individuels décontaminés ou tubes individuels stériles jetables par exemple)

7.3. Extraction et purification des ADN ou ARN

Le mode opératoire est décrit dans chacune des méthodes spécifiques par couple hôte / organisme nuisible. Cette étape est une étape critique dans les analyses de détection.
Voir paragraphes « modification des méthodes officielles » en préambule, 4.2.2. et 4.2.3.).

Des précautions seront prises pour la manipulation des contrôles positifs de processus, afin d'éviter toute contamination croisée. Par exemple, lors d'une série d'extraction, le contrôle positif de processus sera traité en avant dernier dans la série et le contrôle négatif de processus sera traité en dernier.

7.4. Réplicats d'analyse

Sauf indication contraire spécifiée dans la méthode spécifique du couple hôte / organisme nuisible concerné, le plan de plaque doit prévoir le dépôt de :

- 2 puits par prise d'essai (voir paragraphe 7.2.) introduit en détection ;
- au moins 1 puits par prise d'essai (voir paragraphe 7.2.) introduit en identification sur organisme nuisible isolé.

En détection, il est fortement recommandé de réaliser une dilution de la solution d'ADN ou ARN obtenue au point 7.3 et d'appliquer les mêmes modalités d'essai que pour la solution pure. Ces dispositions sont obligatoires si indiquées comme telles dans les méthodes d'analyses spécifiques.

7.5. Mélange réactionnel

Le mélange réactionnel à respecter (nature et concentration des amorces, de la ou des sondes, la concentration en chlorure de magnésium, dNTPs, mélange maître,…) est décrit dans chacune des méthodes spécifiques par couple hôte / organisme nuisible.

Tout changement apporté sur la composition du mix doit faire l'objet d'une évaluation préalable par le laboratoire utilisateur visant à vérifier *a minima* le maintien ou l'amélioration de la qualité des résultats. Cette évaluation sera transmise pour validation au laboratoire national de référence.

7.6. Amplification

Le programme d'amplification à respecter (hot start éventuel, paliers et durées pour les phases de dénaturation, hybridation et amplification) est décrit dans chacune des méthodes spécifiques par couple hôte / organisme nuisible.

Les éventuels changements apportés au programme d'amplification doivent faire l'objet d'une évaluation préalable par le laboratoire utilisateur qui sera transmise pour validation au laboratoire national de référence.

Remarque : Les produits d'amplification doivent toujours être conservés dans une enceinte différente de celles utilisées pour la conservation des réactifs (tels que les mélanges maîtres), des échantillons et des extraits d'échantillons. La localisation et l'utilisation de ces enceintes doivent permettre de respecter les exigences de maîtrise des circuits définies dans le point « précaution(s) particulière(s) à prendre ».

Des précautions seront prises pour la manipulation des contrôles positifs de processus et des contrôles positifs de PCR, afin d'éviter toute contamination croisée. En particulier, dans une série de tests PCR, ces derniers seront traités en avant dernier dans la série, et le contrôle négatif de PCR sera traité en dernier. Les tubes contenant des cibles en forte concentration (ex contrôle positif cloné) seront ouverts avec beaucoup de précautions pour éviter les aérosols.

La préparation des master mix et leur distribution s'effectueront obligatoirement dans une salle ou un emplacement séparé(e) avec un jeu de micropipettes dédiées, en utilisant des cônes neufs, obligatoirement à filtre.

A la fin de l'amplification, les produits de PCR peuvent être conservés jusqu'à une semaine au réfrigérateur et jusqu'à un mois au congélateur avant électrophorèse.

7.7. Caractérisation des amplicons en point final

7.7.1. Par poids moléculaire

7.7.1.1. La migration sur gel

L'électrophorèse et la coloration des produits de PCR doivent s'effectuer conformément à chaque méthode.

Les tubes seront ouverts avec beaucoup de précaution pour éviter les aérosols.

Sauf stipulé dans la méthode, préparer des gels de taille adaptée à la série à analyser, en utilisant une solution d'agarose en surfusion parfaitement homogène et de concentration adaptée à la taille du (des) produit(s) amplifié(s). A titre d'exemple, un gel à 1- 1,5 % est adapté pour résoudre des produits d'amplification de taille comprise entre 100 et 1000 paires de bases.

Le dépôt des produits de PCR ne peut s'effectuer qu'une fois le gel parfaitement durci et refroidi. Sauf si le gel est maintenu immergé dans le tampon de migration, il est déconseillé de préparer ce dernier plus de deux heures avant le dépôt des échantillons car le gel aura tendance à se déshydrater, et absorbera partiellement par capillarité les produits de PCR lors de leur chargement

Le dépôt du mélange produit de PCR / tampon de charge (quelques microlitres) sera effectué en prenant garde de ne pas provoquer de contaminations croisées entre deux puits. Un puits par ligne de dépôt sera réservé au dépôt d'un marqueur de taille du commerce (généralement une échelle comportant des fragments de taille multiple de 100 paires de base).

L'électrophorèse sera réalisée sous une tension et pendant une durée suffisante pour pouvoir correctement mesurer la taille de l'amplifiat par comparaison au marqueur de poids moléculaire.

7.7.1.2. La révélation

Pour la révélation des gels, ces derniers seront incubés au minimum 10 minutes dans une solution de bromure d'éthidium (ou équivalent) régulièrement changée ou rechargée.

Le système de capture d'image doit être suffisamment performant pour assurer une qualité d'image où les bandes sont aisément repérables. De préférence, le système doit aussi permettre le stockage des données.

7.7.2. Par séquençage

Le laboratoire doit choisir un prestataire assurant une qualité de séquençage et d'analyse de séquence compatible avec le niveau d'exigences des méthodes officielles. Pour cela, il peut par exemple envoyer des amplifiats d'organismes proches de ceux de la cible pour vérifier que les séquences rendues sont correctes ou n'entachent pas la spécificité de la méthode.

7.7.3. Par profil de restriction

Le laboratoire doit mettre en œuvre les témoins et les marqueurs de taille appropriés définis dans les méthodes officielles spécifiques pour l'interprétation des résultats. Les exigences du paragraphe 7.7.1 et 4.2.1 s'appliquent.
Une zone distincte devra être réservée pour l'ouverture des tubes et l'incubation devra se faire dans une enceinte à température contrôlée dans laquelle aucun échantillon destiné à être extrait n'est introduit.
L'incubation de la digestion enzymatique se fera de préférence en cycleur plutôt qu'en incubateur pour limiter l'évaporation.

7.7.4. Par hybridation

Le laboratoire doit mettre en œuvre les témoins appropriés définis dans les méthodes officielles spécifiques pour l'interprétation des résultats.

7.8. Caractérisation des amplicons en PCR en temps réel

Durant l'amplification d'un fragment d'ADN, la fluorescence émise augmente de façon exponentielle avant de fléchir (effet plateau) par manque de réactif(s). Un exemple d'amplification pouvant être observée lors d'un run est donné avec la figure 1 ci-dessous.

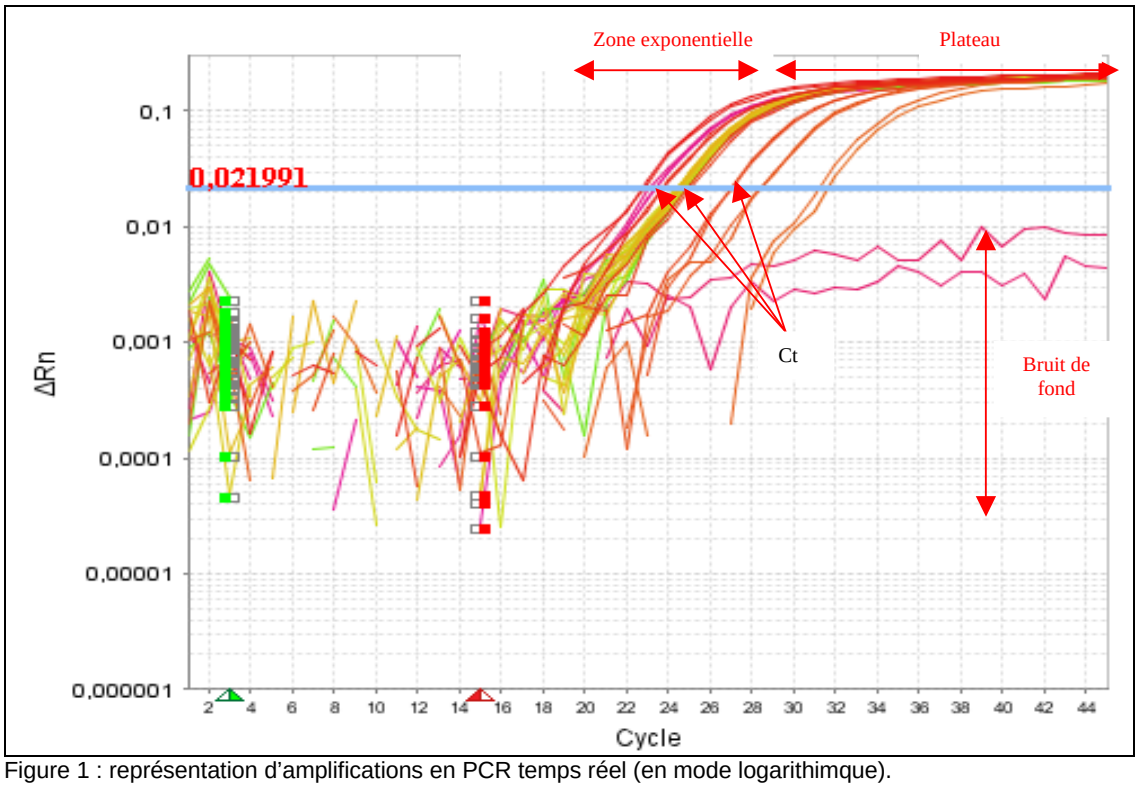


Figure 1 : représentation d'amplifications en PCR temps réel (en mode logarithimque).

Le cycle théorique (abscisse) pour lequel le niveau de fluorescence mesuré dépasse la valeur de seuil fixée (threshold) définit le Ct (cycle threshold) de l'échantillon. Pour être prise en compte, l'augmentation brute de fluorescence autour du Ct doit être de nature exponentielle, c'est-à-dire apparaître sous une forme linéaire en échelle logarithmique.

- Un échantillon pour lequel la valeur de fluorescence reste sous le « threshold » est considéré négatif pour la cible recherchée, au seuil de détection de la méthode, et si aucun effet inhibiteur significatif n'a été mis en évidence,
- Un échantillon pour lequel la valeur de fluorescence dépasse le « threshold », avec une cinétique de nature exponentielle, est considéré positif pour la cible recherchée.

En l'absence d'indication dans les méthodes officielles spécifiques correspondante, et mis à part les tests utilisant des intercalants d'ADN nécessitant une phase d'analyse des courbes de dénaturation, la présence d'une amplification dans un puits sera considérée comme un résultat positif quel que soit le Ct correspondant.

Les méthodes officielles spécifiques par couple hôte / organisme nuisible peuvent néanmoins définir :

- les modalités selon lesquelles la ligne de seuil doit être positionnée (dépend également du logiciel utilisé) ;
- des valeurs de Ct au-delà desquelles un échantillon doit être considéré comme négatif ou douteux (cut-off) ;
- les règles de définition de la plage constituant le bruit de fond.

8. Résultats

8.1. Vérification de l'interprétabilité des résultats

Un minimum d'observations préalables est nécessaire avant l'exploitation des résultats des échantillons

Les résultats de la PCR sont validés si :

- le(s) témoin(s) positif(s) (processus, amplification,…) ont donné une amplification (l'amplicon ayant la taille attendue en PCR conventionnelle). Dans le cas contraire, l'assurance d'obtenir un résultat positif sur une prise d'analyse contaminée n'est pas garantie ;
- et il n'y a pas eu d'amplification dans les témoins négatifs. Dans le cas contraire, l'assurance d'avoir un résultat négatif sur une prise d'analyse non contaminée n'est pas garantie.

Dans le cas contraire, selon la nature de ces incidents et compte tenu de son expérience, le responsable technique évalue la pertinence à interpréter tout ou partie des résultats.
Le tableau suivant donne à titre indicatif les interprétations possibles et actions à mettre en œuvre en fonction des comportements observés pour les différents contrôles.

Tableau 3 : Interprétation et actions possibles en fonction du comportement des différents témoins

Type de contrôle	comportement	Interprétation	Action à mettre en oeuvre
Contrôle négatif de processus	**NEGATIF**	il n'y a pas eu de contamination de la série d'échantillons lors de la phase de broyage / extraction d'ADN OU ARN, pas de faux-positifs générés à cette étape	S/o
	Positif	il y a eu contamination de la série d'échantillons lors de la phase de broyage / extraction d'ADN OU ARN, des faux-positifs peuvent avoir été générés à cette étape	Manipulation non validée, refaire une série de broyage et d'extraction d'ADN OU ARN à partir des échantillons originaux si non détruits
Contrôle négatif de PCR	**NEGATIF**	il n'y a pas eu de contamination de la série d'échantillons lors de la phase préparation du master mix / addition des solutions d'ADN OU ARN à tester, pas de faux-positifs générés à cette étape	S/o
	Positif	il y a eu contamination de la série d'échantillons lors de la phase préparation du master mix / addition des solutions d'ADN OU ARN à tester, des faux-positifs ont pu être générés à cette étape	Manipulation non validée, repréparer un master mix et effectuer une nouvelle PCR à partir des mêmes solutions d'ADN OU ARN à tester. .
Contrôle positif de processus	**POSITIF**	L'ensemble des conditions mises en œuvre pendant l'analyse ont permis de produire des solutions d'ADN OU ARN utilisables à partir des échantillons (validation des consommables, de l'opérateur, du matériel utilisé lors de l'extraction). Ce contrôle peut faire office de contrôle positif de PCR.	S/0
	Négatif	Un ou plusieurs facteurs (opérateur, consommable chimique ou plastique, appareil, etc.) ont dysfonctionné pendant l'analyse et n'ont pas permis de produire des solutions d'ADN OU ARN utilisables	Manipulation non validée, refaire une série de broyage et d'extraction d'ADN OU ARN à partir des échantillons originaux si non détruits

Type de contrôle	comportement	Interprétation	Action à mettre en oeuvre
Contrôle positif d'extraction	**POSITIF**	L'ensemble des conditions mises en œuvre pendant l'extraction d'ADN OU ARN ont permis de produire des solutions d'ADN OU ARN utilisables à partir des échantillons (validation des consommables, de l'opérateur, du matériel utilisé lors de l'extraction).	S/o
Contrôle positif d'extraction	Négatif	Un ou plusieurs facteurs (opérateur, consommable chimique ou plastique, appareil, etc.) ont dysfonctionné pendant la phase d'extraction et n'ont pas permis de produire des solutions d'ADN OU ARN utilisables ou la présence significative d'inhibiteurs dans l'extrait d'ADN OU ARN rend cette dernière non exploitable par PCR..	Manipulation non validée, refaire une série de broyage et d'extraction d'ADN OU ARN à partir des échantillons originaux si non détruits
Contrôle négatif d'extraction	**POSITIF**	il y a eu contamination de la série d'échantillons lors de la phase d'extraction, des faux-positifs ont pu être générés à cette étape	Manipulation non validée, refaire une série d'extraction d'ADN OU ARN à partir des échantillons originaux si non détruits
	Négatif	il n'y a pas eu de contamination de la série d'échantillons lors de la phase d'extraction, pas de faux-positifs générés à cette étape	S/o
Contrôle positif de PCR	**POSITIF**	L'ensemble des conditions mises en œuvre pour l'amplification par PCR ont permis l'amplification de la cible du test en excès (validation des consommables, de l'opérateur, du thermocycleur, etc.)	S/o
	Négatif	Un ou plusieurs facteurs (opérateur, consommable chimique ou plastique défectueux ou oublié, thermocycleur, micropipette) ont *fortement* dysfonctionné pendant la préparation de la PCR et n'ont pas permis l'amplification de la cible en excès.	Manipulation non validée, préparer un nouveau master mix de PCR et relancer une PCR avec un nouveau prélèvement à partir des solutions d'ADN ou ARN à tester.
Contrôle positif de PCR en limite de détection	**POSITIF**	L'ensemble des conditions mises en œuvre pour l'amplification par PCR ont permis l'amplification de la cible du test en limite de détection (validation des consommables, de l'opérateur, du thermocycleur, etc.). La performance de la PCR était à son maximum et a permis de détecter la plus petite quantité d'ADN ou ARN cible dans un échantillon testé.	S/o
	Négatif	Un ou plusieurs facteurs (opérateur, consommable chimique ou plastique, thermocycleur, micropipette) ont *faiblement* dysfonctionné pendant la préparation de la PCR. La performance de la PCR n'était pas à son maximum et n'a pas permis l'amplification de la cible en limite de détection.	Si le contrôle positif de PCR est lui aussi négatif : manipulation non validée, préparer un nouveau master mix de PCR et relancer une PCR avec un nouveau prélèvement à partir des solutions d'ADN ou ARN à tester. Si le contrôle positif de PCR est positif, seuls le résultat des échantillons négatifs est remis en question et procéder avec eux comme décrit ci dessus. Les résultats des échantillons positifs sont par contre validés.
Témoin interne d'amplification	**POSITIF**	La solution d'extrait d'ADN ou ARN de l'échantillon considéré ne contenait pas de composés inhibiteur en quantité suffisante pour la rendre non amplifiable	S/o

Type de contrôle	comportement	Interprétation	Action à mettre en oeuvre
	Négatif	La solution d'extrait d'ADN ou ARN de l'échantillon considéré contenait une quantité significative de composés inhibiteurs et l'a rendu impropre à l'amplification par PCR.	Résultat de l'échantillon considéré non validé., car il peut s'agir d'un faux négatif. Tester à nouveau une dilution au 10ème de l'extrait d'ADN OU ARN par PCR. Si le TIA reste négatif, l'échantillon sera dit inexploitable pour analyse PCR. Si toutefois la cible (organisme nuisible) a amplifié correctement, le résultat peut être validé.
Contrôle de spécificité	**NEGATIF**	L'ensemble des conditions mises en œuvre pour l'amplification par PCR ont permis de garantir sa spécificité (validation des consommables, de l'opérateur, du thermocycleur, etc.).	S/o
	Positif	Un ou plusieurs facteurs (opérateur, consommable chimique ou plastique, thermocycleur, micropipette) ont *faiblement* dysfonctionné pendant la préparation de la PCR (trop de $MgCl_2$, température d'hybridation non respectée, etc.). La spécificité de la PCR n'est pas garantie.	Manipulation non validée, préparer un nouveau master mix de PCR et relancer une PCR avec un nouveau prélèvement à partir des solutions d'ADN OU ARN à tester.

8.2. Interprétation et formulation des résultats

Les tableaux donnés ci-après définissent le résultat ou la conduite à tenir en fonction du nombre de puits et de prises d'essais.

Dans le cas d'une prise d'essai unique avec deux puits :

Puits 1	puits 2	**Résultat / conduite à tenir**
+	+	Positif
-	-	Négatif
+	-	PCR à refaire. PCR 2 : Résultats concordants = résultat final rendu au client Résultats discordants (1 puits positif) : résultat final positif

Dans le cas de 2 prises d'essai sans répétition :

Prise d'essai A	Prise d'essai B	**Résultat / conduite à tenir**
+	+	Positif
-	-	Négatif
+	-	Après vérification de l'absence de contaminations croisées ou d'erreur de dépôt, positif

Dans le cas de 2 prises d'essai avec répétition :

Prise d'essai A		Prise d'essai B		**Résultat**
puits 1	puits 2	puits 1	puits 2	
+	+	+	+	Positif
+	-	+	+	Positif
-	-	+	+	Positif
+	-	+	-	PCR à refaire. PCR 2 : Si au moins 2 positifs sur 4 (quelles que soient les prises d'essai), le résultat est interprété comme positif, sinon négatif
+	-	-	-	PCR à refaire. PCR 2 : Si au moins 2 positifs sur 4 (quelles que soient les prises d'essai), le résultat est interprété comme positif, sinon, négatif
-	-	-	-	Négatif

En PCR temps réel, lorsque la méthode spécifique fait également appel à un témoin d'amplification interne (ADN végétal ou universel par exemple), les règles d'interprétation des Ct obtenus pour l'échantillon vis-à-vis de la cible et du TIA sont précisées dans la méthode.

9. Elimination des matériels susceptibles d'être contaminants

Le laboratoire doit mettre en œuvre des mesures prenant en compte les risques liés aux matériels susceptibles d'être contaminants pour garantir la non dissémination de l'organisme nuisible dans l'environnement.

10. 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
GLO 001	Glossaire des termes techniques en vigueur au LNPV
REP 001	Répertoire des recettes en vigueur au LNPV

BIBLIOGRAPHIE SUCCINCTE

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

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.

ANNEXE I – TABLEAU DE CORRESPONDANCE

DG2/03 version a septembre 2003	MOA 022
2.1 Personnel.	
2 Exigences et recommandations techniques supplémentaires	1. Objet. (Précaution(s) particulière(s) à prendre.)
2.2 Locaux. 2.4 Réception des échantillons.	2. Domaine d'application.
	3. Présentation schématique de la détection
	3.1. Principes techniques
1 Introduction	3.1.1. La PCR conventionnelle (« point final »)
	3.1.2. La PCR en temps réel
1 Introduction	3.2. Applications
	4. Produits et consommables
	4.1. Préconisations techniques
	4.1.1. Les amorces (= « primers, oligonucléotides »)
	4.1.2. Les sondes (- d'hybridation, FRET, balises moléculaires, scorpions, etc.)
	4.1.3. L'ADN polymérase thermostable
	4.1.4. La transcriptase inverse
	4.1.5. La solution tampon de réaction enzymatique (ADN polymérase)
	4.1.6. Le chlorure de magnésium
2.5 Produits et consommables.	4.1.7. Les désoxyribonucléosides triphophates (dNTP)
	4.1.8. Mélange commercial (MasterMix commercial pour la PCR en temps réel par ex.)
	4.1.9. L'eau
	4.1.10. Additifs de PCR
	4.1.11. Produits chimiques pour la détection des produits PCR (ex. Bromure d'éthidium)
	4.2. Contrôles de la qualité des produits et consommables
	4.2.1. Généralités
	4.2.2. Extraction des ADN ou ARN et kits d'extraction / de purification
	4.2.3. Validation des amorces
	4.2.4. Validation des sondes
	4.2.5. Validation du mastermix, de l'ADN polymérase thermostable, de la transcriptase inverse
	4.2.6. Validation globale du processus
2.3 Matériel.	5. Appareillage et matériel
	5.1. Petit matériel requis :
	5.2. Gros matériel requis:
	5.3. Maintenance et contrôles des appareils critiques

DG2/03 version a septembre 2003	MOA 022
	5.3.1. Centrifugeuses
	5.3.2. Micropipettes
	5.3.3. Thermocycleurs
	5.3.3.1. Dispositifs de régulation de température
	5.3.3.2. Système optique
	5.3.4. Appareils pour électrophorèse en gel
	5.3.4.1. Systèmes de migration
	5.3.4.2. Systèmes de visualisation
	5.3.5. Spectrophotomètres, luminomètres, et fluorimètres
	5.3.6. Autres équipements
2.6.1 Emploi et nature des prises d'analyse de référence dans les analyses. 2.6.2 Qualités minimales requises des prises d'analyse de référence.	6. Contrôles et témoins
	7. Etapes de l'analyse
2.4 Réception des échantillons.	7.1. Réception des échantillons.
2.6 Mode opératoire. 2.6.3 Mise en oeuvre des analyses.	7.2. Préparation des échantillons et prises d'essai
	7.3. Extraction et purification des ADN ou ARN
	7.4. Réplicats d'analyse
	7.5. Mélange réactionnel
	7.6. Amplification
	7.7. Caractérisation des amplicons en point final
	7.7.1. Par poids moléculaire
	7.7.1.1. La migration sur gel
	7.7.1.2. La révélation
	7.7.2. Par séquençage
	7.7.3. Par profil de restriction
	7.7.4. Par hybridation
	7.8. Caractérisation des amplicons en PCR en temps réel
2.6.4 Lecture et interprétation des résultats.	8. Résultats
	8.1. Vérification de l'interprétabilité des résultats
	8.2. Interprétation et formulation des résultats
	9. Elimination des matériels susceptibles d'être contaminants
	10. Conservation des reliquats de matériels utilisés
	LISTE DES DOCUMENTS OFFICIELS APPELES PAR LA METHODE
	REMERCIEMENTS
	BIBLIOGRAPHIE SUCCINCTE
Annexe : Schéma du principe de l'amplification par Polymerase Chain Reaction (PCR)	
	ANNEXE I – Tableau de correspondance