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 la qualité et de la protection des végétaux
Bureau de 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/2012-02-013
MOD10.21 E 01/01/11

NOTE DE SERVICE

DGAL/SDQPV/N2012-8041

Date: 21 février 2012

A l'attention de mesdames et messieurs les Préfets

Date de mise en application :	Immédiate
Abroge et remplace :	La publication de la méthode ML/03/15 version b
Date d'expiration :	Sans objet
Date limite de réponse/réalisation :	
Nombre d'annexes :	1
Degré et période de confidentialité :	Aucun

Objet : Méthode officielle d'analyse MOA 025 relative à la détection de *Monilinia fructicola* (Winter) Honey sur fruits, fleurs, tissus lignifiés ou sur culture fongique, par la technique d'amplification par polymérisation en chaîne.

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 025 relative à la détection de *Monilinia fructicola* (Winter) Honey sur fruits, fleurs, tissus lignifiés ou sur culture fongique, par la technique d'amplification par polymérisation en chaîne

Mots-clés : Mycologie - méthode officielle d'analyse - MOA - détection - *Monilinia fructicola* - *Monilinia laxa* - *Monilinia fructigena* - fruits - fleurs - rameaux- tissus végétatifs - culture fongique - *Prunus* spp., *Malus* spp., *Pyrus* spp..

Destinataires
Pour information : DRAAF et DAAF Anses-Laboratoire de la santé des végétaux

La présente note a pour objet la publication officielle de la méthode de détection de *Monilinia fructicola* (Winter) Honey, agent de chancres sur rameaux, de dépérissement des fleurs et de pourriture des fruits qui se dessèchent et se « momifient ». La gamme d'hôtes de ce champignon couvre les arbres fruitiers de la famille des Rosaceae (principalement les *Prunu*s spp., et à un moindre niveau les *Malus* spp.et *Pyrus* spp.).

M. fructicola, classé comme organisme de quarantaine au niveau de l'Union Européenne et de lutte obligatoire sur tout le territoire national, a été mis en évidence en France en 2001 dans le département du Gard, sur pêchers (OEPP/EPPO, 2002). Depuis ce pathogène a été identifié dans plusieurs régions (Aquitaine, Midi-Pyrénées, Provence-Alpes-Côte-d'Azur, Rhône-Alpes)(MAAPRAT, 2008).

Ce champignon, originaire d'Amérique du Nord, provoque des symptômes comparables à ceux de *Monilinia fructigena* et *Monilinia laxa* mais semble plus virulent que ces deux espèces indigènes. Il se développe à des températures plus basses et peut donc infecter les inflorescences et les rameaux à un stade plus précoce.
Le champignon survit sur les organes infectés dont les fruits momifiés et les chancres sur rameaux. Au printemps, le vent, la pluie, les insectes dispersent les spores qui débutent l'infection.

La gravité de la maladie est largement déterminée par les conditions climatiques et *M. fructicola* peut-être responsable de pertes importantes avant et après récolte des fruits notamment sur *Prunus* spp. (Ogawa and English,1991).

A l'import, les marchandises constituant le plus grand risque de dissémination du pathogène sont notamment les plants de pépinières, dans une certaine mesure les greffons et les fruits frais

Vous trouverez en annexe à cette note d'information la méthode offcielle d'analyse qui permet de détecter *Monilinia fructicola* dans des tissus végétatifs d'arbres fruitiers de la famille des Rosaceae ou sur culture fongique. La présence de *M. fructicola* est mise en évidence par deux tests PCR (Polymerase Chain Reaction) consécutifs qui ciblent des loci différents et indépendants dans le génome du champignon (test de détection et test de confirmation).

Le Directeur général de l'Alimentation
Signé : M. Patrick Dehaumont

METHODE OFFICIELLE D'ANALYSE

Détection de *Monilinia fructicola* (Winter) Honey sur fruits, fleurs,tissus lignifiés ou sur culture fongique, par la technique d'amplification par polymérisation en chaîne

Réf. : MOA 025 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 15 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
ML/03/15 version b			Janvier 2006	Février 2012 + 3 mois[1]
MOA 025 version consultation	Décembre 2011	Janvier 2012	-	-
MOA 025 version 1a			Février 2012	

[1] La MOA025 modifiant peu la ML/03/15 dans ses modes opératoires mais introduisant de nouveaux témoins visant à renforcer l'assurance de la validité des résultats, la durée de validité de la précédente méthode (ML/03/15 version b) est ramenée à 3 mois et non 15.

SOMMAIRE

PREAMBULE 5
Objet des méthodes officielles 5
Glossaire, abréviations et documents connexes 5
Limites imposées aux laboratoires agréés ou reconnus 5
Échantillonnage et échantillon 5
Modification des méthodes officielles 5
Considérations d'ordre métrologique 6
Obligations réglementaires et limites de responsabilité 6
Revue des méthodes officielles, amendement et modification 7

ORIGINE DE LA METHODE ET REMERCIEMENTS 8

PRINCIPALES MODIFICATIONS PAR RAPPORT A LA VERSION PRECEDENTE 9
Modifications 9
Améliorations 9

DESCRIPTION DE LA METHODE 10
1. Objet. 10
2. Domaine d'application. 10
3. Présentation schématique de la détection 12
4. Produits et consommables 12
4.1. Tampons 12
4.2. Autres réactifs et consommables 13
5. Appareillage et matériel 15
6. Contrôles et témoins 15
6.1. Pour toute série de test PCR "ITS1Mfcl/ITS4Mfcl" 16
6.2. Pour toute série de test PCR "IMf-F/IMf-R" 17
7. Echantillonnage et Prise d'essai 17
7.1. Echantillonnage 17
7.2. Prise d'essai 18
8. Etapes de l'analyse 18
8.1. Broyage des prises d'essai 18
8.2. Extraction et purification de l'ADN Total 20
8.3. Test des solutions d'ADN cible par PCR "ITS1Mfcl/ITS4Mfcl" (test de détection) et "IMf-F/IMf-R" (test de confirmation) 20
9. Résultats 23
9.1. Validation de l'analyse 23
9.2. Interprétation et formulation des résultats 24

10.Élimination des matériels susceptibles d'être contaminants 24
11.Conservation des reliquats de matériels utilisés 25

LISTE DES DOCUMENTS OFFICIELS APPELES PAR LA METHODE 26

BIBLIOGRAPHIE SUCCINCTE 27

ANNEXE 1: Diagramme décisionnel 28

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.

Tout autre modification (qui n'a pas d'incidence prévisible sur le résultat) doit néanmoins faire l'objet d'une documentation apportant la preuve qu'elle n'interfère effectivement pas avec le résultat. Cette documentation est tenue en permanence à disposition du LNR.

Le ministère chargé de l'agriculture peut souhaiter faire profiter l'ensemble des laboratoires réalisant des analyses officielles des avantages que peuvent représenter les méthodes dérivées et alternatives qui lui sont proposées, en intégrant certaines modifications à l'occasion d'une révision de la méthode officielle. Le laboratoire à l'origine de l'amélioration est, dans ce cas, cité dans la méthode officielle.

CONSIDERATIONS D'ORDRE METROLOGIQUE

Afin d'alléger la lecture des méthodes officielles, seules les valeurs cibles des grandeurs mesurées sont indiquées dans le corps du texte, en unités du système international ou unités dérivées. Les erreurs maximales tolérées (EMT) à prendre en considération sont données dans le tableau ci-après (dans le cas contraire, des spécifications sont précisées dans le texte des méthodes).

Volume	**volume < à 10 mL** : EMT = ± 10% **Volume ≥ à 10 mL** : EMT = ± 5 %
Masse	EMT = 10%
pH	EMT = 0,3 u
Température	**incubateur** : EMT = ± 3°C **réfrigérateur** : 5°C et EMT = ± 4°C **congélateur** : ≤ -18°C **congélateur froid intense** : ≤ -65°C
Longueur	EMT = 10%
Temps	EMT = 10%

OBLIGATIONS REGLEMENTAIRES ET LIMITES DE RESPONSABILITE

La mise en œuvre des méthodes officielles s'applique sans préjudice des réglementations françaises et communautaires ou des exigences normatives auxquelles doivent se soumettre les laboratoires (circulation, détention, manipulation des organismes nuisibles, détention des substances réglementées, bonnes pratiques de laboratoire, santé et sécurité au travail, mesures de confinement, agrément des laboratoires, déclaration à la commission de génie génétique …).
Dans un certain nombre de cas, les méthodes peuvent appeler l'attention des lecteurs sur des risques potentiels liés par exemple à la dangerosité de certains produits ou à la rupture du confinement. Ces mises en garde ne sont destinées qu'à aider les lecteurs et n'ont vocation ni à être exhaustives, ni à se substituer aux exigences réglementaires existantes.
Toute personne physique ou morale constatant la présence, sur un végétal, une partie de végétal ou un produit d'origine végétale, d'un organisme nuisible réglementé a l'obligation d'en faire déclaration auprès des services régionaux de l'alimentation des directions régionales de l'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 suggestions 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 mise au point , optimisée et évaluée par l'Unité de Mycologie du Laboratoire de la Santé des Végétaux.
Le travail de relecture et de revue documentaire a été effectué par le pôle développement de méthodes 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.

MODIFICATIONS

Par rapport à la méthode ML/03/15 vb, les modifications suivantes ont été effectuées :

- Introduction d'un **témoin positif de PCR en limite pratique de détection** permettant de vérifier que la réaction de PCR s'est déroulée de façon optimale.
- Introduction d'un **témoin positif de processus** permettant de vérifier le bon déroulement du processus d''extraction d'ADN.
- Modification de la composition du mélange réactionnel PCR ITS1Mfcl/ITS4Mfcl (Ajout de BSA et modification de la concentration en $MgCl_2$)
- Modification de la composition du mélange réactionnel PCR IMf-F/IMf-R (Ajout de BSA)

AMELIORATIONS

Changement de format dans l'écriture de la méthode ML/03/15, selon un nouveau standard.

DESCRIPTION DE LA METHODE

Détection *de* ***Monilinia fructicola*** *(Winter) Honey*
sur fruits, fleurs, tissus lignifiés ou sur culture fongique
par la technique d'amplification par polymérisation en chaîne

1. Objet.

Conformément à l'arrêté du 8 mai 2000 (Directive 2000/29/CE) relatif aux exigences sanitaires des végétaux ou produits végétaux (Annexe I, Partie AI) *Monilinia fructicola* est considéré comme organisme de quarantaine.

Le champignon *Monilinia fructicola* (Winter) Honey, est un ascomycète de la famille des Sclerotiniaceae. Sa forme imparfaite (stade conidien) est *Monilia fructicola* Batra.
La gamme d'hôte de ce champignon couvre les arbres fruitiers de la famille des Rosaceae, principalement le *Prunus persica* et d'autres *Prunus* spp, à un moindre niveau les *Malus* spp. et les *Pyrus* spp..
M. fructicola est un agent de chancre des rameaux, de dépérissement des fleurs et de pourriture des fruits. Ces symptômes peuvent aussi être causés par deux autres champignons du même genre : *M. fructigena* et *M. laxa,* qui contrairement à *Monilinia fructicola,* ne sont pas classés comme organismes de quarantaine pour l'Union Européenne..

L'objet de cette méthode est de détecter la présence de *M. fructicola* dans un échantillon végétal ou d'après une culture de champignon(s). La présence de *M. fructicola* est mise en évidence par deux tests PCR (Polymerase Chain Reaction) consécutifs qui ciblent des *loci* différents et indépendants dans le génome du champignon.

- *Premier test PCR* (test de détection ITS1Mfcl/ITS4Mfcl):
  La portion d'ADN détectée et amplifiée est située dans la zone des espaceurs internes transcrits (ITS) de l'ADN ribosomique nucléaire (Ioos and Frey, 2000). Elle est présente à de multiples copies dans le génome.
- *Second test PCR* (test de confirmation IMf-F/IMf-R):
  La portion d'ADN détectée et amplifiée est non codante mais spécifique de *M. fructicola* (Ma *et al.,* 2003). Elle est *a priori* présente en copie unique dans le génome.

Pour une vision globale du protocole, cf. le diagramme décisionnel en **Annexe 1**.

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

La méthode présentée est à utiliser pour les analyses officielles, notamment dans le cadre des contrôles phytosanitaires en surveillance du territoire, à l'import ou à l'export de végétaux.

2. Domaine d'application.

Objets susceptibles d'être soumis à analyse.

La méthode permet de détecter *M. fructicola* sur des fruits, des fleurs, des tissus lignifiés. Elle permet aussi de confirmer l'identification de *M. fructicola* isolé en culture pure.

Limitations relatives aux objets susceptibles d'être soumis à analyse

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

Les échantillons doivent arriver au laboratoire conditionnés **en microtube plastique stérile de 2 mL (à fond arrondi et non conique)**. Tout échantillon reçu non correctement conditionné (trop rempli, non hermétiquement fermé ou extérieur du tube "sale" et non décontaminé) sera autoclavé pour des raisons de précaution phytosanitaire.

Grandeur de l'objet soumis à analyse.

La méthode s'applique sur tissus végétatifs: le fruit en voie de nécrose (symptôme d'attaque de *Monilinia*), le fruit momifié, la fleur ou le rameau présentant des symptômes de type chancre ainsi que sur tout fragment de culture pure.
Un échantillon correspond à un regroupement de plusieurs prélèvements ponctuels effectués à différents endroits à la surface d'un même fruit ou d'un même fruit momifié ou d'une fleur entière, ou un fragment de rameau présentant un chancre. Il peut enfin s'agir d'une culture pure de champignon réalisée à partir d'un isolement mycologique effectué sur l'un des organes énoncés plus haut.
Un lot correspond à un ensemble d'échantillons individuels prélevés dans le même verger (= unité géographique).

Précaution(s) particulière(s) à prendre.

Après prélèvement, les tubes hermétiquement fermés devraient être obligatoirement plongés et agités pendant 30 secondes dans une solution désinfectante d'eau de javel titrant environ 2,6 % de chlore actif puis séchés avec du papier absorbant. Cette phase permet d'éliminer toutes traces de contaminations externes du tube par le *M. fructicola* qui pourraient se produire lors de la mise en tube.

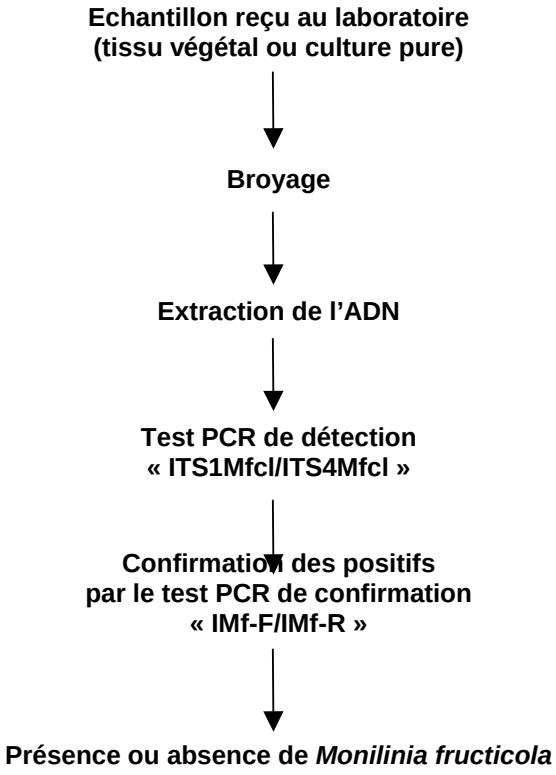
Les échantillons doivent être conservés au congélateur avant envoi. Ce dernier devra s'effectuer par transport rapide à destination du laboratoire d'analyse.

Avant analyse, les échantillons peuvent être conservés dans leur tube jusqu'à 6 mois au congélateur.

Après extraction d'ADN les extraits peuvent être conservés congelés pendant 1 an.

L'exigence de confinement pour la manipulation de formes viables de cet agent pathogène à dissémination aérienne doit être de type NS3, dans la mesure où le laboratoire d'analyse est situé en zone indemne.

3. Présentation schématique de la détection



4. Produits et consommables

En règle générale, le manipulateur doit veiller (par l'utilisation de produits et consommables certifiés, nettoyage, stérilisation ou tout autre traitement approprié) à l'absence dans l'eau, produits et consommables utilisés, de contamination (ADN ou ARN), de nucléase, d'inhibiteur ou de tout autre élément pouvant interférer sur le résultat.
Les recommandations des fournisseurs, concernant les conditions de conservation avant et pendant utilisation, seront suivies, ainsi que la conservation en cours d'utilisation. A défaut le laboratoire définira les conditions qu'il jugera les plus optimales.

4.1. Tampons

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

Tris Borate EDTA (TBE) :
Il est recommandé de se procurer cette solution tampon prête à diluer à la concentration 5 ou10 X. Le TBE est ensuite dilué dans de l'eau osmosée à 0.5 X pour son utilisation pour la préparation des gels d'électrophorèse et du tampon d'électrophorèse.
Il est toutefois envisageable de le fabriquer soit même en l'autoclavant avant emploi.
Composition du TBE 5X :

- Tris [hydroxyméthyl] aminométhane : 450 mM
- Acide borique : 450mM
- EDTA (Ethylène Diamine Tétracetate disodium salt) en solution de 0.5 M, pH8 : 10 mM

Tampon de charge d'ADN amplifié :
La composition de ce tampon est la suivante:
Bleu de Bromophénol : 0.25 % (Poids/volume)
Xylène cyanol : 0.25 % (Poids/volume)
Saccharose en solution dans du TBE 0.5 X : 40 % (Poids/volume)

Une solution du commerce prête à l'emploi peut également être utilisée.

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

4.2. Autres réactifs et consommables

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

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

Eau de Javel ou solution d'hypochlorite de Sodium (NaOCl) à environ 2,6% de chlore actif [produit corrosif à manipuler avec précaution]

Kits d'extraction d'ADN :
L'ADN total des échantillons analysés (à la fois ADN végétal, ADN fongique, et éventuellement bactérien, viral etc.) est extrait et purifié à l'aide de mini kits d'extraction d'ADN de plantes disponibles dans le commerce (ex. dans Ioos *et al*., 2005). Le type de kit d'extraction choisi doit avoir démontré son efficacité par rapport à l'extraction classique au C.T.A.B. et purification au phénol-chloroforme (Henrion *et al*., 1996 ; Ioos and Frey, 2000).

Oligonucléotides

PCR de première détection:

Séquence de l'amorce sens«**ITS1Mfcl**[a]»:	5' – TAT GCT CGC CAG AGG ATA ATT - 3'
Séquence de l'amorce antisens «**ITS4Mfcl**[a]» :	5' – TGG GTT TTG GCA GAA GCA CAC T – 3'

[a] Ioos and Frey, 2000

La spécificité de ces amorces repose en grande partie sur la séquence de leur portion 3'-terminale. Il est donc nécessaire d'utiliser pour ce test de première détection des amorces « ITS1Mfcl et ITS4Mfcl » de niveau de purification supérieure pour garantir cette spécificité (absence d'amorces incomplètes).

PCR de confirmation:

Séquence de l'amorce sens«**IMf-F**[b]»:	5' – ATG CAG AAG TGT GAA TAG GGC CT - 3'
Séquence de l'amorce antisens «**IMf-R**[b]» :	5' – CGA AGG ATG AGA GGA AGA TTA GGG – 3'

[b] Ma *et al*., 2003.

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

ADN polymérase thermostable :

Toutes les ADN polymérases thermostables sont utilisables pourvu qu'elles aient démontré une sensibilité et une spécificité relatives au moins aussi bonne que celle décrite dans Ioos et Iancu (2008) lors d'essais préliminaires effectués sur extraits d'ADN total d'isolats référencés de *M. fructicola*, dans des conditions d'utilisation décrites dans la présente méthode.
La polymérase à ADN doit être conservée au congélateur. La date de péremption doit être vérifiée avant utilisation.

Chlorure de Magnésium ($MgCl_2$)

Ce dernier est fourni généralement par le fabricant avec l'ADN polymérase, en tube séparé ou directement en mélange dans le tampon de l'ADN polymérase.

Désoxyribonucléiques triphosphate (dNTPs)
- 2'-deoxy-adenosine - 5'-triphosphate (dATP)
- 2'-deoxy-cytidine - 5'-triphosphate (dCTP)
- 2'-deoxy-guanosine - 5'-triphosphate (dGTP)
- 2'-deoxy-thymidine - 5'-triphosphate (dTTP)

Ces 4 désoxyribonucléiques triphosphates sont mélangés et conservés en solution équimolaire au congélateur, sous forme de parties aliquotes de faible volume.

Bovine Serum Albumin (qualité biologie moléculaire)
Ce composé est livré sous forme de poudre. Il est reconstitué dans de l'eau ultra pure à raison de 10mg/mL et stérilisé par filtration à travers une membrane de 0,2 µm. Il peut être conservé sous forme liquide jusqu'à 3 mois au réfrigérateur et 6 mois au congélateur.

Agarose : voir MOA REP 001
L'agarose utilisé doit être spécialement conçu pour la fabrication de gels d'électrophorèse. Etant donné le poids moléculaire des régions amplifiées (environ 350 et 450 paires de bases) ces derniers sont préparés à une concentration de 1 à 1,5 g d'agarose pour 100 mL de TBE 0.5X.

Marqueurs de poids moléculaire :
Il est recommandé d'utiliser une échelle de poids moléculaires comportant des fragments de tailles multiples de 100 paires de bases. Ceci permet d'estimer rapidement la taille des fragments amplifiés sur un gel et de la comparer à la taille attendue (ici 356/468 pb). Le mélange de marqueurs de poids moléculaire doit être préparé en suivant les préconisations du fournisseur.

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

Autres consommables à usage unique

⇨ Consommables plastiques
- Microcônes stériles à filtre 1-10 µL
- Microcônes stériles à filtre 10-20 µL
- Microcônes stériles à filtre 20-100 µL
- Microcônes stériles à filtre 20-200 µL
- Microcônes stériles à filtre 100-1000 µL
- Microcônes stériles 1-10 µL
- Microcônes stériles 20-200 µL
- Microcônes stériles 100-1000 µL
- Microtubes de centrifugation stériles de 1.5 et 2 mL
- Microtubes stériles pour PCR de volume adapté au puits du thermocycleur utilisé, à paroi fine

⇨ Matériaux de broyage

Selon la méthode de broyage utilisée :

- **Pistons plastiques stériles autoclavables pour broyage de tissus**, adaptés au broyage en microtube de 2 mL

- **Mortiers et pistons en porcelaine stérilisés par autoclavage**

- **Billes de broyage en carbure de tungstène ou acier de 2 à 3 mm de diamètre** :

Avant utilisation, elles seront lavées au détergent puis abondamment rincées et égouttées. Elles sont ensuite séchées et stérilisées au four pasteur (environ 2 h à ±180°C).

- **Billes de céramique et sable abrasif**
- **Tout autre matériau permettant d'obtenir un broyage aussi efficace qu'avec les systèmes cités plus haut.**

5. Appareillage et matériel

- Autoclave à pression de vapeur
- Thermocycleur programmable
- Bain marie ou bain à sec pour microtubes
- Réfrigérateur ou chambre froide
- Congélateur
- Transilluminateur à ultra-violet (environ 300 nm)
- Balance de précision (+- 10 mg) de portée adaptée (0.10 g à 100 g)
- Cuve à électrophorèse immergée horizontale
- Générateur de tension pour électrophorèses immergées (min 120 V)
- Centrifugeuse équipée d'un rotor à microtubes, permettant d'obtenir une vitesse centrifuge variable entre 600g (=rcf) et 20000g (=rcf).
- Système de production de glace pilée (recommandé)
- Agitateur oscillateur à plateau permettant l'agitation douce des bains de coloration des gels d'électrophorèse (facultatif)
- Jeu de micropipettes (gamme de 1 µL à 1000 µL) pour l'extraction d'ADN total
- Jeu de micropipettes (gamme de 1 µL à 1000 µL) pour la fabrication du mélange réactionnel de PCR et chargement des ADN extraits des échantillons à tester
- Micropipette (gamme de 10 à 20 µL) pour la manipulation d'ADN "post PCR"
- Système de cuve pour coloration des gels d'électrophorèse au Bromure d'éthidium et rinçage des gels
- Agitateurs de type Vortex
- Broyeur de tissus avec adaptateur et portoirs pour tubes de 2 mL (de type TissueLyser-Qiagen ou FastPrep- MP ou tout autre système de broyage permettant d'obtenir des résultats équivalents)

Facultatif mais recommandé :

- Système de prise de vue sensible à la fluorescence (caméra CCD ou polaroïd) et de sauvegarde (sur fichier informatique)
- Hotte à ambiance stérile (à flux laminaire ou poste de sécurité microbiologique) pour préparation du mélange réactionnel et chargement des échantillons dans les tubes de PCR (si possible deux hottes ou postes séparés)

6. Contrôles et témoins

Ces contrôles sont définis par la norme AFNOR XP V03-043.

L'utilisation de ces contrôles et témoins permet de s'affranchir de contrôles métrologiques classiques (volumes, pH, résistivité, température, certificats, etc.), l'interprétation des résultats obtenus avec les différents types de contrôles et témoins permet de valider ou non *a posteriori* l'ensemble du matériel, des consommables, de la manipulation et des résultats. En revanche, il est recommandé d'effectuer un minimum de maintenance des appareils utilisés et de garantir un minimum de traçabilité des consommables utilisés pour pouvoir réagir en cas de problème ou de non-validation de manipulation. L'homogénéité des thermocycleurs comprenant un bloc à puits doit en outre être vérifiée, lorsque ce type de machine est utilisé.

Les contrôles utilisés dans cette méthode sont des cibles d'ADN clonées dans des plasmides bactériens. Ils sont réputés parfaitement stables dans le temps s'ils sont conservés congelés.
La technique de détection de régions cibles d'ADN d'un organisme par la technique de PCR autorise l'utilisation d'une série de contrôles et témoins permettant de valider la bonne qualité de la manipulation. Ces contrôles et témoins ont différentes fonctions et leur utilisation permet de garantir que :
- *i)* l'opérateur a correctement suivi le protocole,
- *ii)* les consommables et réactifs utilisés étaient de qualité suffisante,
- *iii)* les volumes prélevés par micropipettes, les températures et durées de réaction, la concentration et le pH des solutions utilisées étaient corrects,
- *iv)* l'extrait d'ADN était suffisant en quantité et amplifiable (pas d'interférence avec des composés inhibiteurs),
- *v)* il n'y a pas eu de contamination accidentelle des échantillons testés,
- vi) il n'y a pas eu d'hybridation croisée avec des organismes phylogénétiquement proches.

6.1. Pour toute série de test PCR « ITS1Mfcl/ITS4Mfcl»:

- **Un Témoin Interne d'Amplification (TIA) sera systématiquement ajouté au mélange réactionnel** Ce témoin correspond à une solution calibrée de plasmides dans lesquels a été inséré un fragment d'ADN sur lequel on a artificiellement greffé la zone cible les amorces de PCR "ITS1Mfcl et ITS4Mfcl". Ce fragment est de taille supérieure à la taille de la cible chez *M. fructicola* (750 pb). La présence de ce témoin dans le mix réactionnel permettra d'amplifier en parallèle un fragment de 750 pb lorsque les S_{ADN} testées contiennent suffisamment peu d'inhibiteurs. Il permet de mettre en évidence les échantillons qui ne seraient pas exploitables par PCR, à cause de la présence significative d'inhibiteurs dans l'extrait («= faux négatifs»). Le TIA sera toutefois amplifié même pour le témoin négatif car il est ajouté directement dans le mélange réactionnel. La concentration finale à utiliser correspond à la plus faible concentration qui permet la coamplification du témoin en limite de détection (**$T+_{LOD}$**)) lorsqu'il n'y a pas de présence significative d'inhibiteur.
- **Un témoin positif de processus (T+$_{PROC}$)**. Il s'agit d'un tube témoin soumis à toutes les étapes de l'analyse en partant de l'extraction, en substituant à la prise d'essai de la matrice artificiellement dopée par l'ajout d'une quantité de séquence cible suffisante pour être détectée. Il permet de vérifier le bon déroulement de l'extraction.
- **Un témoin positif en excès** («**T+fcl**») correspondant soit à un extrait d'ADN génomique d'un isolat référencé de *M. fructicola,* soit à des solutions calibrées de plasmides bactériens contenant la cible du test PCR « ITS1Mfcl/ITS4Mfcl » (Ioos and Frey, 2000). La solution de **T+fcl** est conservée au congélateur. Ce contrôle sera systématiquement testé conjointement aux prises d'essais lors de toute série de PCR. Il s'agit d'un contrôle positif permettant de vérifier que le mélange réactionnel a été correctement préparé et que les conditions d'amplification par PCR ont été respectées.
- **Un témoin négatif de processus (T-$_{PROC}$) ou un témoin négatif d'extraction (T-$_{extr.}$)** sera préparé pour toute série d'extractions. Une prise d'échantillon "vide" (= "T-$_{extr}$"), c'est à dire un microtube de 2 mL stérile vide, subira donc toutes les phases de l'analyse (prise d'essai- broyage-extraction-PCR) pour vérifier l'absence de contamination lors de la prise d'essai et de la phase d'extraction d'ADN (1er type de faux positif). Il est possible de remplacer cet échantillon vide par un extrait d'ADN prêt à l'emploi ne présentant aucun risque d'amplification croisée avec les tests de PCR décrits ci après ou par un échantillon de fruit reconnu non contaminé par *M. fructicola* (témoin négatif de processus, T-$_{PROC}$). L'un ou l'autre sera testé lors de chaque réaction de PCR pour vérifier l'absence de contamination croisée entre échantillons ou de contamination externe lors de la phase d'extraction d'ADN.
- **Un témoin positif en limite pratique de détection** (**$T+_{LOD}$**) sera systématiquement testé lors de chaque réaction de PCR. Il permet de vérifier que la réaction PCR s'est effectuée de façon optimale (conditions thermodynamiques, volumétriques, et chimiques) pour que la plus petite quantité détectable de *M. fructicola* puisse avoir été détectée dans un échantillon par ce protocole. Ce $T+_{LOD}$ est constitué d'une solution calibrée d'ADN génomique d'une souche référencée de *M. fructicola* ou d'une solution calibrée de plasmides bactériens dans lesquels est insérée la cible du test PCR "ITS1Mfcl/ITS4Mfcl" (Ioos and Frey, 2000). Ce $T+_{LOD}$ doit être caractérisé par le laboratoire dans ses propres conditions. En pratique, le $T+_{LOD}$ peut être défini comme la plus petite quantité de cible produisant un résultat positif dans 100 % des cas.
- **Deux témoins de spécificité** correspondants à deux autres espèces indigènes de *Monilinia*: *M. fuctigena* et *M. laxa* seront testés lors de chaque réaction de PCR «ITS1Mfcl/ITS4Mfcl». Il s'agit de témoins négatifs permettant de vérifier que les conditions de stringence durant la PCR sont optimales

et préviennent une amplification non spécifique. $T+_{fgn}$ et $T+_{lx}$ correspondent à des solutions d'ADN génomique de souches référencées de *M. fructigena et de M. laxa* ou de solutions calibrées de plasmides bactériens dans lesquels est insérée la région génomique homologue chez ces espèces. Ces solutions sont de même concentration que le témoin positif en excès «T+fcl».

- **Un témoin négatif d'amplification** (**T-** ou **NTC,** no template control) sera systématiquement introduit lors de chaque réaction de PCR. Une prise d'échantillon "eau" subira donc toutes les phases de l'analyse à partir de la préparation du mélange réactionnel de PCR pour vérifier l'absence de contamination lors de cette phase et lors du chargement des $\mathbf{S_{ADN}}$ dans les tubes individuels de PCR (2^{eme} type de faux positifs).

6.2. Pour toute série de test PCR «IMf-F/IMf-R»:

- **Un témoin positif de processus** ($T+_{PROC}$): cf. paragraphe 6.1.
- **Un témoin positif en excès** («**T+IMf**») correspondant soit à un extrait d'ADN génomique d'un isolat référencé de *M. fructicola*, soit à des solutions calibrées de plasmides bactériens contenant la cible du test PCR "IMf-F/IMf-R". La solution de T+IMf est conservée au congélateur. Ce contrôle sera systématiquement testé conjointement aux prises d'essais lors de toute série de PCR "IMf-F/IMf-R". Il s'agit d'un contrôle positif permettant de vérifier que le mélange réactionnel a été correctement préparé et que les conditions d'amplification par PCR ont été respectées.
- **Un témoin positif en limite pratique de détection** (**$T+_{LOD}$**) sera systématiquement testé lors de chaque réaction de PCR"IMf-F/IMf-R". Il permet de vérifier que la réaction PCR s'est effectuée de façon optimale (conditions thermodynamiques, volumétriques, et chimiques) pour que la plus petite quantité détectable de *M. fructicola* puisse avoir été détectée dans un échantillon par ce protocole. Ce $T+_{LOD}$ est constitué d'une solution calibrée d'ADN génomique d'une souche référencée de *M. fructicola* ou d'une solution calibrée de plasmides bactériens dans lesquels est insérée la cible du test PCR"IMf-R/IMf-R" . Ce $T+_{LOD}$ doit être caractérisé par le laboratoire dans ses propres conditions. En pratique, le $T+_{LOD}$ peut être défini comme la plus petite quantité de cible produisant un résultat positif dans 100 % des cas.
- **Un témoin négatif d'amplification** (**T-** ou **NTC,** no template control): cf. paragraphe 6.1.

Certains des témoins utilisés dans cette méthode sont constitués de cibles d'ADN insérées dans des plasmides bactériens. Ils sont réputés parfaitement stables dans le temps s'ils sont conservés congelés.

7. Echantillonnage et prise d'essai

La récolte des fruits, des fleurs ou des chancres s'effectue en portant des gants en latex à usage unique (les fruits atteints de moniliose présentent souvent à leur surface une abondante sporée de *Monilinia*, très facilement mise en suspension dans l'air, il faut donc éviter de «ramener» des spores d'un verger à l'autre pour des raisons prophylactiques mais aussi pour éviter la contamination des échantillons indemnes du champignon («faux-positifs») lors de l'analyse.

Pour chaque nouveau prélèvement, une nouvelle paire de gants ainsi qu'une nouvelle lame de scalpel devront être utilisés. Il est fortement conseillé d'utiliser des scalpels stériles jetables conditionnés sous blister. Un même scalpel peut être utilisé sous réserve de le désinfecter par trempage quelques secondes dans une solution d'eau de javel titrant environ 2,6 % de chlore actif suivi d'un rinçage à l'eau stérile.
Le test de détection utilisant une technique d'amplification spécifique d'ADN, l'alcool n'est d'aucun usage car s'il a un effet biocide limité, il ne déstructure pas du tout l'ADN du champignon. Seule l'hypochlorite de Sodium (eau de javel) à une concentration suffisante permet de détruire l'ADN.

7.1. Echantillonnage

7.1.1. Prélèvement sur un fruit

De fines lamelles de la surface du fruit (maximum de 2 mm d'épaisseur) seront prélevées à l'aide d'une lame de scalpel stérile et placées dans un microtube plastique stérile de 2 mL à fond arrondi qu'on

refermera immédiatement. Prélever uniquement dans les zones nécrosées et préférentiellement dans celles présentant des coussinets sporifères (biomasse de *Monilinia* plus importante à ces endroits).
Pour un fruit ou un fruit momifié donné, un volume maximum de 300/400 µL sera prélevé (cela représente environ le quart du tube de 2 mL). Il faut impérativement éviter de remplir le tube au plus du quart de son volume car ceci rendrait son analyse impossible.

7.1.2. Prélèvement sur une inflorescence

Sur une inflorescence présentant des symptômes d'attaque de *Monilinia* sp., une fleur entière est prélevée à l'aide d'une lame de scalpel stérile et placée dans un microtube plastique stérile de 2 mL qu'on refermera immédiatement. Plusieurs fleurs peuvent être prélevées mais chacune sera placée individuellement dans un microtube.

7.1.3. Prélèvement sur un chancre

Sur un rameau présentant un ou des chancres typique d'une attaque de *Monilinia*, de fines lamelles de la zone chancreuse (maximum de quelques mm^3 pour chacune d'entre elles) seront prélevées à l'aide d'une lame de scalpel stérile et placées dans un microtube plastique stérile de 2 mL qu'on refermera immédiatement. Prélever uniquement dans la zone du chancre ou en limite de la zone nécrosée.
Pour un chancre donné, un volume maximum de 300-400 µL sera prélevé. Il faut impérativement éviter de remplir le tube de 2mL au plus du quart de son volume car ceci rendrait son analyse impossible.

7.1.4. Prélèvement sur une culture pure

Le prélèvement doit s'effectuer sur une culture de champignon de moins de 15 jours. Sur une culture pure de champignon, un maximum de mycélium aérien est prélevé en raclant la surface de la culture à l'aide d'une lame de scalpel stérile. La récolte est placée dans un microtube plastique stérile de 2 mL qu'on refermera immédiatement. S'agissant d'une culture mycologique, il n'est pas nécessaire de prélever autant de matériel que sur tissu végétal. Une quantité de mycélium récolté ayant le volume d'une bille de 3-4 mm de diamètre est suffisante.

7.1.5. Identification de l'échantillon

Les tubes seront individuellement identifiés à l'aide d'un marqueur permanent et leur référence sera reportée sur une fiche de prélèvement.

7.2. Prise d'essai

Le tube contenant l'échantillon à analyser, et prélevé comme énoncé plus haut, constitue la prise d'essai.

8. Etapes de l'analyse

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

8.1. Broyage des prises d'essai

L'objectif du broyage de la prise d'essai est de permettre d'homogénéiser ce dernier et de faciliter la libération d'un maximum d'ADN total lors de l'incubation dans le tampon de lyse.
Avant broyage, les prises d'essai congelées sont décongelées sur la paillasse à température ambiante.
Pour toute série d'extractions et quelle que soit la technique utilisée, un blanc d'extraction sera effectué. Une prise d'échantillon "vide" (="**$T\text{-}_{extr}$**") subira donc toutes les phases de l'analyse pour vérifier l'absence

de contamination lors de la phase d'extraction d'ADN (1er type de faux positif). Il est possible de remplacer cet échantillon vide par un extrait d'ADN prêt à l'emploi ne présentant aucun risque d'amplificatiion croisée avec les tests de PCR décrits ci-après (témoin négatif de processus, **T-$_{PROC}$**).
Tout système de broyage autre que ceux cités ci-dessous est utilisable à condition d'obtenir une efficacité équivalente.

8.1.1. Broyage oscillant aux billes de verre, d'acier ou de carbure de tungstène ou autre système oscillant

Ce type de broyage est particulièrement bien adapté pour la prise d'essai constituée de prélèvements sur fruits, fleur ou culture pure de champignon. L'utilisation de billes de verre est toutefois à exclure pour le broyage de tissu lignifié.
Dans la mesure du possible, ce type de broyage sera préféré au broyage au piston rotatif car il est montré qu'il dégrade moins les macromolécules d'ADN total de l'échantillon.

a) Prélever deux billes de verre, d'acier ou de carbure de tungstène (ou utiliser les tubes et le matériau de broyage approprié si un autre système est utilisé).
b) Ouvrir le microtube contenant la prise d'essai et y transférer les billes
c) Prélever à l'aide d'une micropipette l'intégralité du volume de tampon de lyse préconisé par le fabricant pour une mini extraction d'ADN. Le tampon de lyse est fourni avec le kit d'extraction. Transférer le tampon de lyse dans le tube. Selon le type de kit d'extraction d'ADN utilisé et si un dosage de l'ADN au spectrophotomètre est prévu, il sera parfois nécessaire à cette étape d'ajouter la RNAse, enzyme qui dégrade les molécules d'ARN. Le volume à ajouter est celui préconisé par le fabricant.
d) Refermer le tube de façon parfaitement étanche. Retourner en l'agitant plusieurs fois le microtube
e) placer le microtube sur le portoir du broyeur et broyer environ 2 minutes à une fréquence d'agitation d'environ 30 Hz. Si le système de broyage n'oscille que dans une seule dimension, pendant la phase de broyage, arrêter à au moins une reprise l'agitation et retourner en l'agitant ou vortexant plusieurs fois le microtube.

8.1.2. Broyage au piston rotatif

Ce type de broyage est adapté pour la prise d'essai constituée de prélèvements sur fruit, fleur ou culture pure de champignon. Il est à exclure pour le broyage de tissu lignifié.

a) Prélever à l'aide d'une micropipette le quart du volume de tampon de lyse préconisé par le fabricant pour une mini extraction d'ADN. Le tampon de lyse est fourni avec le kit d'extraction.
b) Ouvrir le microtube contenant la prise d'essai et y transférer le tampon de lyse, refermer le tube immédiatement.
c) Fixer un piston de broyage au moteur rotatif
d) Ouvrir le microtube contenant la prise d'essai et y plonger le piston de broyage.
e) Broyer la prise d'essai pendant une durée variant de 30 secondes à 1 minute à une vitesse comprise entre 2000 et 3000 trs/min, selon la consistance de la prise d'essai. A la fin de ce broyage, de petites particules de tissu végétal ou mycélien doivent être visibles dans le broyat. Toute la prise d'essai ne doit pas être forcément réduite à l'état de petites particules.
f) Retirer délicatement le piston du tube et du moteur rotatif et le plonger immédiatement dans un bécher contenant une solution d'eau de javel titrant environ 2,6 % de chlore actif. Changer de gants si ils sont entrés en contact avec du broyat.
g) Ajouter là l'aide d'une micropipette le complément du tampon de lyse fourni avec le kit d'extraction (soit les ¾ restant du volume préconnisé).
h) Selon le type de kit d'extraction d'ADN utilisé et si un dosage de l'ADN au spectrophotomètre est prévu, il sera parfois nécessaire à la fin de cette étape d'ajouter la RNAse, enzyme qui dégrade les molécules d'ARN. Le volume à ajouter est celui préconisé par le fabricant.
i) Fermer le microtube de façon parfaitement étanche, le retourner plusieurs fois doucement puis le passer 5 secondes au vortex.

8.1.3. Broyage au mortier

Ce type de broyage est particulièrement adapté pour tout type de prise d'essai (prélèvement sur fruits, fleur, tissu lignifié ou culture pure de champignon). On le réservera toutefois au broyage de tissu lignifié, étant donné son aspect peu pratique en analyse de routine.

a) Transférer la prise d'essai contenue dans le microtube dans un mortier stérile.
b) Verser délicatement l'équivalent de 10 mL d'azote liquide sur la prise d'essai
c) Lorsque les 3/4 du volume d'azote liquide se sont évaporés, commencer à broyer délicatement mais fermement la prise d'essai.
d) Lorsque la totalité de l'azote liquide s'est évaporé, accentuer fortement l'intensité de broyage jusqu'à l'obtention soit d'une consistance de poudre plus ou moins grossière dans le cas de tissus lignifiés ou de fleur, soit d'une consistance de pâte dans le cas d'autres tissus.
e) Prélever l'intégralité du broyat à l'aide d'une spatule stérile et le transférer dans un microtube stérile.
f) Immerger le mortier et le pilon dans une solution d'eau de javel titrant environ 2,6 % de chlore actif
g) Prélever à l'aide d'une micropipette l'intégralité du volume de tampon de lyse préconisé par le fabricant pour une mini extraction d'ADN. Le tampon de lyse est fourni avec le kit d'extraction.
h) Ouvrir le microtube contenant la prise d'essai broyée et y transférer le tampon de lyse, refermer le tube immédiatement.
i) Selon le type de kit d'extraction d'ADN utilisé, il sera parfois nécessaire à cette étape d'ajouter la RNAse, enzyme qui dégrade les molécules d'ARN. Le volume à ajouter est celui préconisé par le fabricant.
j) Fermer le microtube de façon parfaitement étanche, le retourner plusieurs fois doucement puis le passer 5 secondes au vortex.

8.2. Extraction et purification de l'ADN Total

Quelle que soit la technique de broyage utilisée, l'extraction d'ADN total s'effectue de la même manière à partir de la prise d'essai broyée.

1. Incuber le microtube contenant la prise d'essai broyée et l'intégralité du volume de tampon de lyse préconisé par le fabricant pour une mini extraction. L'incubation s'effectue au bain marie ou au bain à sec à la température et pendant la durée préconisée par le fabricant de kits d'extraction.
2. Suivre ensuite le protocole d'extraction et de purification indiqué par le fabricant en y incluant obligatoirement au préalable une phase de centrifugation (environ 4 min autour de 14000 g) permettant de culotter les débris cellulaires. Le surnageant est ainsi prélevé et transféré dans un nouveau microtube stérile. Le microtube contenant le culot cellulaire est refermé et jeté.
3. A la fin du mode opératoire prescrit par le fabricant, l'ADN total extrait est conservé sous forme de solution mère dans le tampon d'élution. Cette solution d'ADN total constituera la solution d'ADN directement analysée par PCR (= "S_{ADN}").
4. Les extraits d'ADN sont conservés au congélateur avant analyse. Il est préférable de réaliser l'analyse sous deux mois maximum. Toutefois, pour la détection de *M. fructicola* dans certains échantillons très "dégradés", il sera parfois nécessaire de diluer cette solution au $10^{ème}$ ou au $100^{ème}$ dans du tampon Tris EDTA (cf. résultats d'amplificabilité du TIA). En cas de non amplificabilité de la solution «S_{ADN}», «$S_{ADN}/10^{ème}$» et «S_{ADN} /$100^{ème}$» seront analysés.

8.3. Test des solutions d'ADN cible par PCR "ITS1Mfcl/ITS4Mfcl" (test de détection) et "IMf-F/IMf-R" (test de confirmation)

8.3.1. Préparation des mélanges réactionnels «ITS1Mfcl/ITS4Mfcl» et «IMf-F/IMf-R»

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

Le volume réactionnel individuel (="**Vreac**") choisi peut se situer entre 20 et 50 µL selon le type de thermocycleur et le type de tubes de PCR choisi. Il est classiquement fixé à 20 µL.

La composition finale est la suivante (adapté d'après Ioos and Frey, 2000 et Ioos and Iancu, 2008):

Mix " ITS1Mfcl/ITS24Mfcl"

Composé	Concentration finale dans Vreac
Eau Ultra Pure	qsp (Vreac- V_{ADN}**)**
Tampon de polymérase à ADN (10 X) fourni avec la polymérase à ADN	1 X
Chlorure de Magnésium	2 mM
Bovine Serum Albumin (10 mg/mL)	0,60µg/µL
Amorce sens "ITS1Mfcl"	0.2 µM
Amorce antisens "ITS4Mfcl"	0.2 µM
T.I.A.	à déterminer préalablement
dNTPs mix 4x25mM	4x0,15 mM
Polymérase à ADN	0.66 U / 20µL de Vreac

Mix « IMf-F/IMf-R » (uniquement pour confirmation des positifs « ITS1Mfcl/ITS4Mfcl »

Composé	Concentration finale dans Vreac
Eau Ultra Pure	qsp Vreac-V_{ADN}
Tampon de polymérase à ADN (10 X) fourni avec la polymérase à ADN	1 X
Chlorure de Magnésium	1.5 mM
Bovine Serum Albumin (10 mg/mL)	0,60µg/µL
Amorce sens "IMf-F"	0.2 µM
Amorce antisens "IMf-R"	0.2 µM
dNTPs mix 4x25mM	4x0,15 mM
Polymérase à ADN	0.66 U / 20µL de Vreac

Préparer un volume total de mix (="**Vmix**") suivant le calcul suivant :

Vmix = **Vreac** x (nombre de prises d'essais testées simultanément +1 [=**Textr**] +1 [=**T+fcl**]+1 [=**T+lx**]+1 [=**T+fgn**]+1 [=**T-**] +2 [=erreurs ou pertes de pipetage])

a) Chaque mix se prépare dans un microtube stérile de 1.5 ou 2 mL, de préférence conservé dans de la glace pilée (non nécessaire si polymérase de type «hotstart» utilisée).
b) Les différents composants, exceptée la polymérase à ADN, sont mis à décongeler sur la paillasse à température ambiante puis homogénéisés par vortexage. On veillera à vortexer vigoureusement le tampon de polymérase et le Chlorure de Magnésium avant prélèvement.
c) Les différents composants sont ajoutés au microtube stérile à l'aide de micropipettes obligatoirement munies de microcônes stériles à embout filtre.
d) La polymérase à ADN est ajoutée en dernier dans le mix
e) Le microtube contenant le mix complet doit être vortexé avant sa distribution. Le mix est de préférence conservé dans de la glace pilée avant sa distribution (non nécessaire si polymérase de type «hotstart» utilisée.

8.3.2. Distribution des mix dans les microtubes de PCR

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

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

L'addition des S_{ADN} à tester ainsi que des solutions d'ADN servant de témoins s'effectueront de préférence dans une zone physiquement séparée de la zone où se sont effectuées la préparation et la distribution du mélange réactionnel. Il est souhaitable d'utiliser un jeu de micropipettes uniquement réservé à cet effet.

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

8.3.4. Paramètres de l'amplification par polymérisation en chaîne

Les différents paramètres de la PCR espèce spécifique pour le test de détection de *M. fructicola* sont les mêmes que pour le test de confirmation de *M. fructicola*. (adapté d'après Ioos and Frey, 2000 et Ioos and Iancu, 2008) :

Etape		**Température de consigne**	**Durée programmée**	**Nombre de répétitions**
1	Dénaturation initiale	94 °C	- **3 min** pour une polymérase classique - **durée préconisée par le fournisseur** pour une polymérase de type Hotstart	1
2	Dénaturation	94°C	30 sec	**35** en cas de détection sur tissu végétal **30** en cas de détection sur culture fongique pure
	Hybridation	**63°C**	30 sec	
	Polymérisation d'ADN	72 °C	60 sec	
3	Elongation finale	72°C	10 min	1

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

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

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

8.3.5.1. Electrophorèse

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

- Préparer un gel d'agarose à 1-1,5 % (ou équivalent) à l'aide de tampon TBE à 0.5 X (cf. paragraphe 4.1.), prévoir une taille de gel et un type de peigne adaptés au nombre de tubes de PCR traités plus un pour le marqueur de poids moléculaire.
- Facultatif mais recommandé : préparer un plan de gel sur lequel est indiqué l'emplacement de chaque amplifiat ainsi que l'emplacement des différents témoins et du marqueur de poids moléculaire.
- Pour n tubes de PCR déposer n gouttes de 2-3 µL de tampon de charge dans n puits d'une plaque de microtitration.
- Prélever chaque amplifiat (environ 8 µL) et le mélanger délicatement par aspiration refoulement avec le tampon de charge (*nota* : le tampon de charge peut être directement ajouté au produit d'amplification dans le tube de PCR au prorata du Vreac).
- Déposer délicatement l'amplifiat mélangé au tampon de charge dans le puits correspondant.
- Lorsque tous les amplifiats, les différents témoins et le marqueur de masse moléculaire sont déposés sur le gel, immerger délicatement le gel chargé dans la cuve d'électrophorèse, vérifier qu'il est suffisamment recouvert de tampon d'électrophorèse, sinon compléter. Mettre ensuite en marche le générateur de tension (4V / cm, pendant 1 heure environ)

8.3.5.2. Révélation du gel d'électrophorèse

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

- Après l'électrophorèse, le gel est incubé environ 15 min dans une cuve contenant de l'eau additionnée de bromure d'éthidium à une concentration voisine de 0.5 µg / mL. La cuve est disposée sur un agitateur à bascule (facultatif).
- Le gel est ensuite placé environ 1 min dans une cuve de "lavage" contenant de l'eau du robinet puis déposé sur un transilluminateur à UV (250 à 300 nm) en veillant à ne pas exposer le manipulateur au rayonnement (port d'un casque à visière filtrante ou utilisation d'une planche filtrante à déposer sur le transilluminateur).
- **Il est conseillé d'effectuer une prise de vue du gel exposé aux UV et d'utiliser cette prise de vue (impression ou fichier informatique) pour analyser les résultats.**

9. Résultats

9.1. Validation des analyses

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

• Le **T-** ne présente aucun fragment amplifié de 356 pb (test de détection) ou 468 pb (test de confirmation) visible => il n'y a pas eu de contamination accidentelle pendant la préparation du mix et l'ajout des S_{ADN}.
• Le T+fcl (test de détection) ou le T+IMf (test de confirmation) présente un fragment amplifié visible et de taille attendue (respectivement 356 et 468 pb) => les conditions de PCR et la composition du mix de PCR ont permis d'amplifier spécifiquement et avec un rendement suffisant la séquence cible chez *M. fructicola*
• LeT+$_{LOD}$ présente un fragment amplifié visible et de taille attendue (356 pb pour le test de détection et 468 pb pour le test de confirmation).
• Le T+proc présente un fragment amplifié visible et de taille attendue (356 pb pour le test de détection et de 468 pb pour le test de confirmation).
• Le T-$_{extr}$ ou le cas échéant le T-proc ne présentent aucun fragment amplifié de 356 pb ou 468 pb visible => il n'y a pas eu de contamination accidentelle pendant la phase d'extraction et de purification d'ADN jusqu'à l'obtention des S_{ADN}.
• Les T+fgn et T+lx ne présentent aucun fragment amplifié visible => les conditions de PCR et la composition du mix ont garanti une spécificité suffisante de l'amplification.

De plus pour le test PCR "ITS1Mfcl et ITS4Mfcl" et pour tout extrait d'ADN ne présentant pas de fragment amplifié de taille attendue (356 pb), il est nécessaire que:
• Le TIA présente un fragment amplifié visible et de taille attendue (environ 750 pb).
Dans le cas contraire, il y a eu inhibition de la PCR et il faut refaire le test sur les S_{ADN} diluées. note: il est possible que pour le T+fcl et pour certaines S_{ADN}, la présence de séquences cibles de *M. fructicola* en bonne quantité dans l'extrait rendent impossible l'amplification du TIA (compétition entre deux fragments, et non amplification du plus grand). Toutefois, la présence de l'amplifiat de la cible ne laisse pas de doute quant à l'absence d'inhibiteur.

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

9.2. Interprétation et formulation des résultats

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

- Si pour une S_{ADN} testée par PCR «ITS1Mfcl/ITS4Mfcl», **un fragment amplifié est visible et qu'il a la taille attendue (environ 356 pb)**, la prise d'essai est dite positive pour *Monilinia fructicola* par le test PCR "ITS1Mfcl/ITS4Mfcl". Cette S_{ADN} sera testée pour confirmation par PCR «IMf-F/IMf-R»**.**
- Si pour une S_{ADN} testée, **aucun fragment amplifié n'est visible ou qu'il n'a pas la taille attendue**, la prise d'essai est dite négative pour *Monilinia fructicola.*
  Le résultat sera alors exprimé par une phrase du type " ***Monilinia fructicola*** **non détecté dans l'échantillon analysé par PCR espèce-spécifique",** en citant la méthode ci-décrite et en précisant le seuil de détection de la méthode**.**
- Si pour une S_{ADN} testée, ainsi que pour ses dilutions éventuelles, **aucun fragment amplifié n'est visible et que le TIA n'a pas correctement amplifié**, le résultat sera alors exprimé par une phrase du type "**échantillon non analysable, présence d'inhibiteurs**".

Et dans le cas d'une confirmation de positif par le test PCR "IMf-F/IMf-R":

- Si pour une S_{ADN} testée par PCR «IMf-F/IMf-R» , **un fragment amplifié est visible et qu'il a la taille attendue (468 pb)**, la prise d'essai est dite positive pour *Monilinia fructicola* par le test PCR«IMf-F/IMf-R».
  Le résultat sera alors exprimé par une phrase du type " ***Monilinia fructicola*** **détecté dans l'échantillon analysé par PCR espèce-spécifique**".

- Si pour une S_{ADN} testée, **aucun fragment amplifié n'est visible ou qu'il n'a pas la taille attendue**, la prise d'essai est dite négative pour *Monilinia fructicola* par PCR « IMf-F/IMf-R ».
  Le résultat sera alors exprimé par une phrase du type "***Monilinia fructicola*** **non détecté dans l'échantillon analysé par PCR espèce-spécifique**".

Le diagramme décisionnel présenté en annexe 1 résume ces conditions.

10. Élimination des matériels susceptibles d'être contaminants

Le laboratoire doit mettre en œuvre des mesures prenant en compte ces risques pour garantir la non dissémination de l'organisme nuisible dans l'environnement.
Les tubes et autres consommables plastiques ayant été utilisés pendant la phase d'extraction – purification d'ADN total peuvent être éliminés sans traitement particulier (plus de parasite viable à ce stade).
Les tubes et autres consommables plastiques ayant été utilisés lors de la phase de préparation du mix et chargement des S_{ADN} peuvent être éliminés sans traitement particulier.

11. Conservation des reliquats de matériels utilisés

Sauf mention contraire explicite ou impossibilité technique avérée, les laboratoires doivent conserver les reliquats pertinents (nature, quantité et qualité) de matériel soumis à analyse, dans des conditions appropriées garantissant leur intégrité, jusqu'à au moins le dixième jour ouvrable suivant l'envoi au demandeur d'un rapport d'analyse concluant à la non mise en évidence de l'organisme recherché. Ce délai imposé est destiné à laisser le temps au demandeur de l'analyse de contester le résultat auprès du laboratoire (ce qui prolonge la conservation du reliquat jusqu'à l'issue de la contestation) et éventuellement de demander une analyse contradictoire.
Dans le cas d'un résultat autre que la non mise en évidence de l'organisme recherché, et sauf indications plus précises dans la méthode, l'ensemble des reliquats pertinents doit être conservé pendant une durée minimale de 12 mois, sauf pour les parties éventuellement transmises à un autre laboratoire agréé ou de référence, à qui est alors transférée la charge de conservation des reliquats. Le laboratoire national de référence peut demander que tout ou partie de ces reliquats lui soient transmis, aux frais des laboratoires agréés ou reconnus, dans le cadre des missions qui lui sont confiées.

LISTE DES DOCUMENTS OFFICIELS APPELES PAR LA METHODE

Référence	Titre
Décret 2006-7 du 4 janvier 2006	Décret 2006-7 du 4 janvier 2006 relatif aux laboratoires nationaux de référence, ainsi qu'à l'agrément et à la reconnaissance des laboratoires d'analyses dans le domaine de la santé publique vétérinaire et de la protection des végétaux, et modifiant le code rural.
Arrëté ministériel du 19 décembre 2007	Arrêté ministériel du 19 décembre 2007 fixant les conditions générales d'agrément des laboratoires d'analyses dans le domaine de la santé publique vétérinaire et de la protection des végétaux.
Norme XP V03 - 043	Exigences générales pour la réalisation d'analyses utilisant la biologie moléculaire pour la détection et l'identification d'organismes pathogènes, d'altération et ravageurs des végétaux et produits dérivés
Dossier d'évaluation	Dossier de validation de la méthode ML/03/15 version b
REP 001	Répertoire des recettes en vigueur au Laboratoire de la Santé des Végétaux
GLO 001	Glossaire des termes techniques en vigueur au Laboratoire de la Santé des Végétaux

BIBLIOGRAPHIE

Anonyme, 1995 : Directive n°95-44/CE du conseil du 26 juillet 1995 fixant les conditions dans lesquelles certains organismes nuisibles, végétaux, produits végétaux et autres objets énumérés aux annexes I à V de la directive 77/93/CEE du conseil peuvent être introduits ou circuler dans la communauté ou dans certaines zones protégées de la communauté pour des travaux à fins d'essais ou à des fins scientifiques ou pour des travaux sur les sélections variétales. *Journal officiel des communautés européennes* du 03/08/95, J.O. N°L184, p 34.

Anonyme, 2000 : Directive n°2000-29 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 des communautés européennes* du 10/07/2000, J.O. N°L 169, p1.

Henrion B, Chevalier G and Martin F (1994) Typing truffle species by PCR, amplification of the ribosomal DNA spacers. *Mycological Research* 98: 37-43.

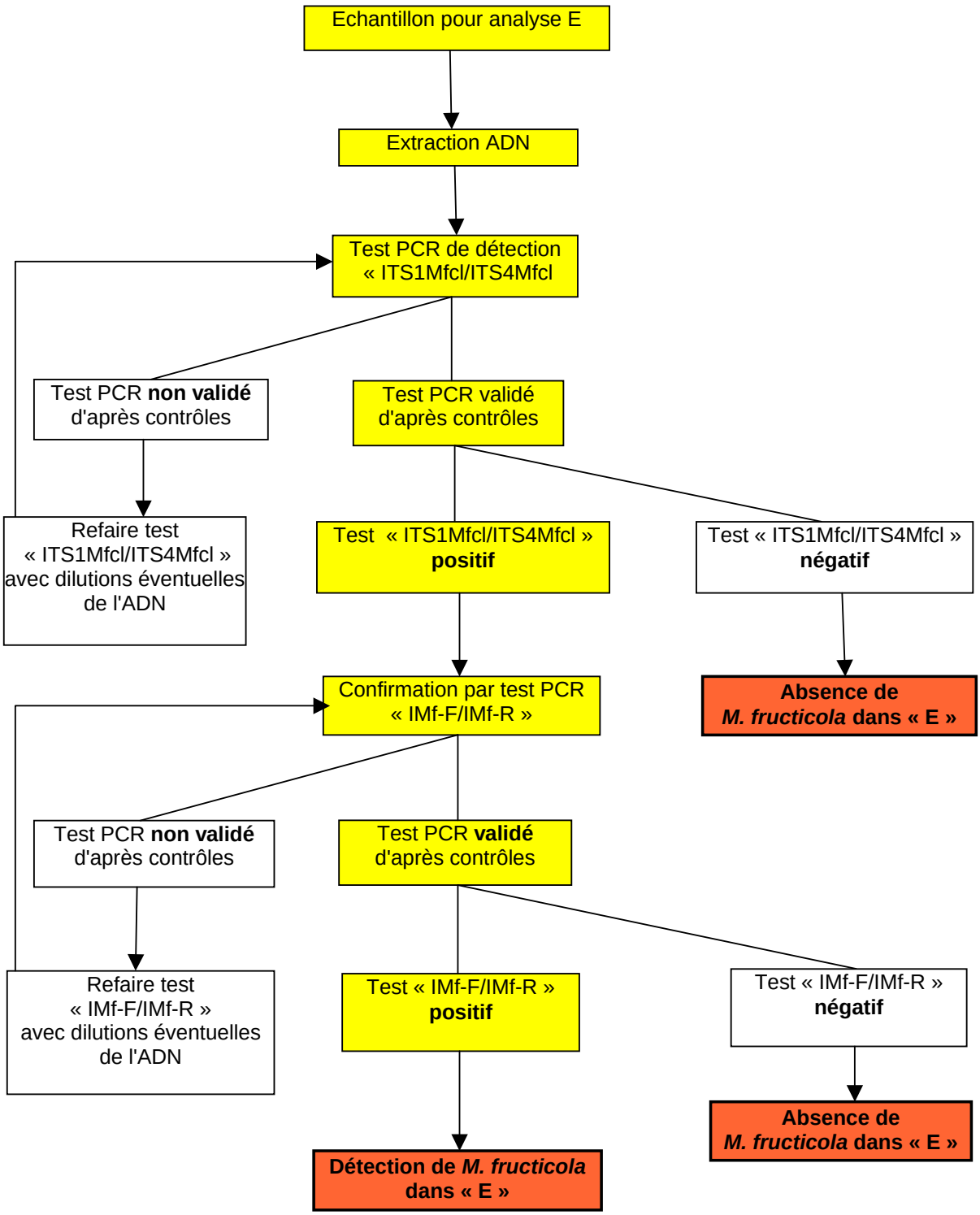
Ioos R. and Frey P. (2000) Genomic Variation within *Monilinia laxa*, *M. fructigena* and *M. fructicola*, and application to species identification by PCR. *European Journal of Plant Pathology* 106: 373-378.

Ioos R., Husson C., Andrieux A. and Frey P. (2005) SCAR-based PCR primers to detect the hybrid pathogen *Phytophthora alni* and its subspecies causing alder disease in Europe. *European Journal of Plant Pathology* 112: 323-335.

Ioos R, Iancu G. (2008): European collaborative studies for the validation of PCR-based detection tests targeting regulated fungi and oomycetes. *Bulletin OEPP/EPPO* Bulletin 2008, 38(2):198-204.

Ma Z., Luo Y. and Michailides T.J. (2003). Nested PCR assays for detection of Monilinia fructicola in stone fruit orchards and *Botryosphaeria dothide*a from Pistachios in California. *Journal of Phytopathology* 151 : 312-322.

ANNEXE 1: DIAGRAMME DECISIONNEL



Pour toute demande à caractère scientifique et technique relative à ce document, le point de contact national désigné par le ministère chargé de l'agriculture est le laboratoire national de référence concerné :

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

Ce document est édité par :

Ministère chargé de l'Agriculture
Direction générale de l'alimentation
Service de la prévention des risques sanitaires de la production primaire
Sous-direction de la qualité et de la protection des végétaux
251 rue de Vaugirard, 75732 PARIS Cedex 15
www.agriculture.gouv.fr

auprès de qui toute autre correspondance peut être adressée.