

Méthode d'analyse en santé des végétaux

RÉFÉRENCE : ANSES/LSV/MA 063 - Version 2

Octobre 2021

Détection de '*Candidatus Liberibacter spp.*', responsable de la maladie du Huanglongbing (HLB), par la technique PCR en temps réel sur nervures et pétioles de plantes hôtes de la famille des Rutaceae

Laboratoire de la Santé des Végétaux

Laboratoire national de référence « Bactéries sur bananier, agrumes et plantes tropicales »

Historique de la méthode

Une méthode est mise à jour afin de prendre en compte des modifications.

Une modification est qualifiée de majeure lorsqu'elle concerne le processus analytique, le domaine d'application ou des points critiques de la méthode, dont la prise en compte peut modifier les performances de la méthode d'analyse et/ou les résultats. Une modification majeure induit des adaptations. La méthode ainsi modifiée a fait l'objet d'une nouvelle validation, totale ou partielle.

Une modification est qualifiée de mineure si elle apporte des précisions utiles ou pratiques, reformule les propos pour les rendre plus clairs ou plus précis, rectifie des erreurs bénignes. Une modification mineure est sans influence sur les performances de la méthode et ne requiert pas une nouvelle validation.

Le tableau ci-dessous récapitule l'historique des versions de la présente méthode, incluant la qualification des modifications.

Version	Nature des modifications (majeure/mineure)	Date	Principales modifications
v1*	Sans objet	Juin 2021	Version initiale
v2	mineure	Octobre 2021	<p>Les principales modifications portent :</p> <ul style="list-style-type: none"> -sur le §4 : des précisions ont été apportées au principe de la méthode et notamment sur le contexte d'utilisation des 2 modalités d'extraction -sur les §7.1 et §8.1 : pour ajouter la possibilité et les conditions de regroupement d'échantillons <p>Le §9.3 « analyses de confirmation » a par ailleurs été supprimé par souci d'harmonisation avec les autres méthodes officielles en santé végétale.</p>

* La version 1 a fait l'objet d'une consultation du 22/03/2021 au 22/04/2021 sur le site internet de l'agence, notamment auprès des laboratoires agréés français.

Avant-propos

La présente méthode a été développée par :

Anses - Laboratoire de la Santé des Végétaux, Unité Ravageurs et agents pathogènes tropicaux.

Laboratoire National de Référence (LNR) pour la détection des bactéries sur plantes tropicales.

Adresse : 7 chemin de l'Irat, Ligne Paradis, 97410 Saint Pierre, Ile de la Réunion.

Contact : saint-pierre.lsv@anses.fr

Les travaux méthodologiques effectués sur la méthode ont donné lieu à un rapport de validation (14/01/2021). Le rapport de validation, ainsi que la méthode ont été revus par des pairs scientifiques, ainsi que l'unité de coordination de la référence du LSV.

Sommaire

Avant-propos	3
Introduction	6
Avertissements et précautions de sécurité	7
1. Objet et domaine d'application	8
2. Documents de référence	8
3. Termes, sigles et définitions	8
4. Principe de la méthode	9
5. Réactifs	10
5.1 Eau.....	11
5.2 Réactifs de biologie moléculaire	11
5.2.1 Kit d'extraction d'ADN	11
5.2.2 Amplification moléculaire (Li <i>et al.</i> , 2006)	11
5.2.2.1 Master mix.....	11
5.2.2.2 Oligonucléotides	11
5.3 Tampons et solutions	11
5.4 Conservation	12
5.5 Autres réactifs et consommables.....	12
5.6 Contrôles et témoins.....	12
6. Appareillage et matériels	13
6.1 Broyeur.....	14
6.2 Thermocycleur pour PCR temps réel.....	14
7 Échantillons	14
7.1 Conditions d'acceptation des échantillons à réception.....	14
7.2 Conservation des échantillons avant analyse	15
7.3 Conservation des échantillons après analyse	15
8 Mode opératoire	16
8.1 Préparation des échantillons pour analyse	16
8.2 Broyage de l'échantillon végétal	17
8.3 Extraction d'ADN en kit.....	17
8.4 Extraction rapide au NaOH.....	17

8.5 Test spécifique de détection par PCR en temps réel (Li et al., 2006).....	18
8.5.1 Préparation du mélange réactionnel en multiplex.....	18
8.5.2 Préparation du mélange réactionnel en simplex.....	18
8.5.3 Cycles thermiques PCR temps réel.....	19
8.6 Analyse des résultats	19
9 Résultats.....	19
9.1 Contrôle qualité	19
9.2 Calculs et expression des résultats	20
9.2.1 Test spécifique de détection par PCR en temps réel.....	20
9.2.2 Formulation des résultats de biologie moléculaire.....	20
10 Caractéristiques de performance de la méthode pour la détection de ‘<i>Candidatus Liberibacter asiaticus</i>’ (Extraction Kit).....	21
11 Caractéristiques de performance de la méthode pour la détection de ‘<i>Candidatus Liberibacter africanus</i>’ (Extraction Kit)	22
12 Caractéristiques de performance de la méthode pour la détection de ‘<i>Candidatus Liberibacter americanus</i>’ (Extraction Kit)	23
Annexe 1 - Recettes.....	24
Bibliographie.....	26

Introduction

'*Candidatus Liberibacter spp.*' regroupe plusieurs espèces de bactéries du phloème difficilement cultivables et notamment pathogènes des agrumes au sens large (famille des *Rutaceae*), provoquant une déficience en zinc, magnésium et autres minéraux dans son hôte. La phase de latence entre la contamination d'un hôte et l'expression des symptômes peut durer plusieurs mois. Actuellement en expansion sur les plantations d'agrumes d'Amérique du Nord, Centrale et du Sud, elle n'est pas présente en Europe (Bové, 2006).

Trois espèces sont responsables de la maladie du HLB :

- '*Candidatus Liberibacter asiaticus*' (CLas)
- '*Candidatus Liberibacter africanus*' (CLaf)
- '*Candidatus Liberibacter americanus*' (CLam)

Seules deux espèces sont tolérantes à la chaleur (CLas et CLam) et une seule espèce présente un contexte épidémiologique particulièrement actif (CLas), notamment dans les régions d'Amérique du Nord (Gottwald, 2010). Les deux autres espèces sont en fort déclin. CLas est d'origine asiatique et a été caractérisé en 1970 dans ces régions. CLam est apparu dans les années 2004-2005 en Amérique Latine (Teixeira et al., 2005), mais n'est pas une mutation spontanée de CLas, car trop de différences génétiques sont observées ; tout comme CLaf, apparu en 1990 en Afrique.

La maladie est propagée par deux psylles vecteurs et entraînent sa diffusion rapide et sur de longues distances : *Diaphorina citri* (CLas et CLam) et *Trioza erytreae* (CLaf). L'efficacité de la vection dépend du couple vecteur/espèces responsables du HLB, mais globalement les deux espèces de psylles sont vectrices des trois espèces de '*Candidatus Liberibacter spp.*' responsables du HLB.

Dans les plantations commerciales, un fort effet de bordure est observé avec une occurrence de la maladie beaucoup plus forte (Gottwald, 2010) ; de même que la concentration des bactéries cibles est plus forte dans les deux premiers tiers du pétiole et est dépendante de la variété d'agrumes (Tatineni et al., 2008; Li et al., 2009).

'*Candidatus Liberibacter spp.*' est considéré comme un organisme de quarantaine dans de nombreux pays. Au niveau de l'Union Européenne, au moment de la parution de cette méthode, les trois espèces responsables du HLB sont listées comme organismes de quarantaine, ainsi que les psylles vecteurs : *D. citri* et *T. erytreae*.

Avertissements et précautions de sécurité

Il convient que l'utilisateur de la présente méthode connaisse bien les pratiques courantes de laboratoire. Il incombe à l'utilisateur d'établir des pratiques appropriées en matière d'hygiène et de sécurité et de s'assurer de la conformité à la réglementation en vigueur.

Il est essentiel que les manipulations conduites conformément à la présente méthode soient exécutés par du personnel ayant reçu une formation appropriée.

Certains réactifs utilisés dans cette méthode peuvent présenter un risque pour l'utilisateur et/ou l'environnement, l'utilisateur doit impérativement suivre les recommandations du fournisseur pour l'utilisation de ces produits et l'élimination des déchets.

Par ailleurs, l'utilisateur de la présente méthode doit mettre en œuvre toutes les mesures nécessaires pour garantir la non-dissémination de l'organisme nuisible dans l'environnement. Ainsi, tout fragment de matériel végétal infecté (ou de statut indéterminé/suspicion) et isolat bactérien en résultant doivent être détruits par autoclavage ou autre moyen inactivant les bactéries.

Les consommables ayant été en contact avec le matériel végétal infecté (ou de statut indéterminé/suspicion) et les isolats bactériens en résultant doivent être détruits par autoclavage ou autre moyen inactivant les bactéries. Le matériel ayant été en contact avec le végétal infecté (ou de statut indéterminé/suspicion) et les isolats bactériens en résultant doit être désinfecté.

1. Objet et domaine d'application

Objet :

La présente méthode vise à détecter '*Candidatus Liberibacter asiaticus*', '*Candidatus Liberibacter africanus*' et '*Candidatus Liberibacter americanus*' dans des nervures et pétioles de feuilles de *Rutaceae* par une technique de biologie moléculaire. Elle repose sur une extraction d'ADN à partir des nervures et pétioles de feuilles et une amplification PCR en temps réel d'un fragment du génome de '*Candidatus Liberibacter spp.*' provoquant le HLB (Li et al., 2006).

Domaine d'application :

Un test PCR en temps réel utilisant un ensemble d'amorces et une sonde dont la combinaison est spécifique pour la détection de CLas, CLaf et CLam provoquant le HLB est proposé dans cette méthode. La méthode s'applique aux échantillons symptomatiques ou asymptomatiques, frais ou lyophilisés de tissus végétaux (nervures et pétioles) de plantes hôtes de la famille des *Rutaceae*. Un échantillon individuel pour une masse de 1 g frais ou 0,35 g lyophilisé sera utilisé pour l'analyse et représentera la prise d'essai. Pour chaque échantillon, l'analyse est réalisée sur une prise d'essai composée de matériel végétal prélevé sur l'ensemble des nervures et pétioles selon la masse requise. Le surplus est conservé pour une éventuelle analyse de confirmation. Pour une prise d'essai, une quinzaine de feuilles est généralement suffisant.

2. Documents de référence

- [1] **MOA 022** : techniques qualitatives d'amplification enzymatique des acides nucléiques : PCR (Polymerase Chain Reaction), RT-PCR (Reverse Transcription-PCR) et PCR temps réel. Détection et identification des organismes phytopathogènes.
- [2] **MOA GLO 001** : glossaire général et technique en vigueur au LNPV.
- [3] **Rapport de caractérisation et de validation** du 14/01/2021 de la méthode de détection par PCR temps réel sur feuilles de '*Candidatus Liberibacter spp.*' provoquant le Huanglongbing sur plantes hôtes de la famille des *Rutaceae*.

3. Termes, sigles et définitions

Les termes employés dans la méthode sont issus des normes, guides ou glossaires nationaux ou internationaux appropriés (AFNOR, ISO, CIPV, OEPP...).

Le glossaire MOA 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 de la méthode d'analyse.

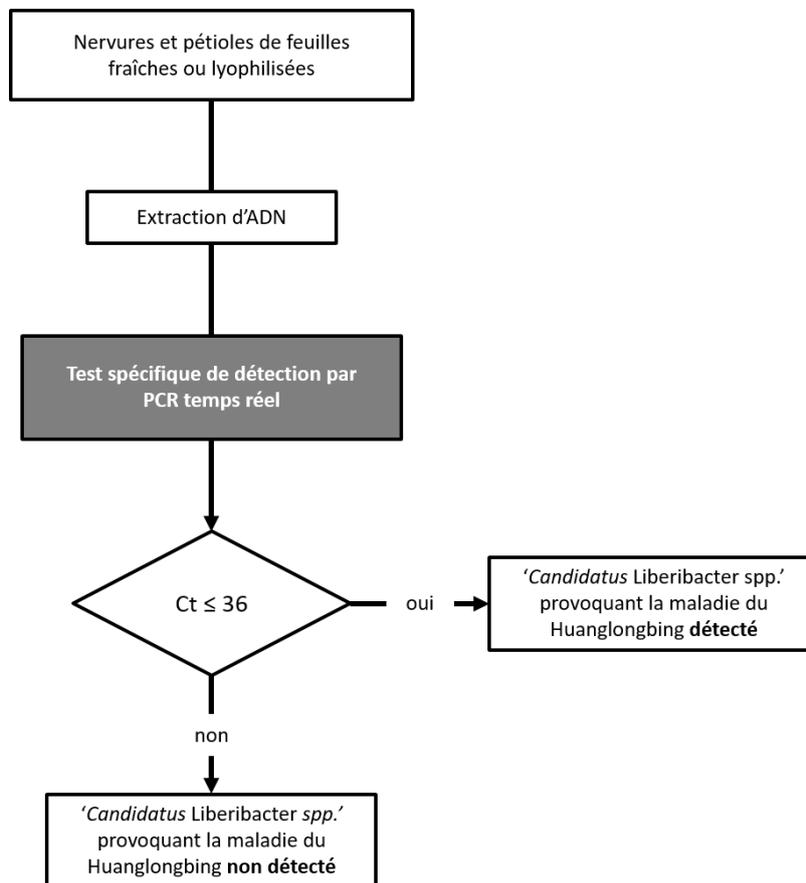
Les sigles sont explicités au fur et à mesure du texte.

4. Principe de la méthode

La méthode doit être utilisée en respectant les recommandations de la méthode générale MOA 022 dans sa version en vigueur.

Les tests composant la méthode présentée dans ce document sont qualitatifs, c'est à dire qu'ils donnent un résultat du type « positif » ou « négatif ». Un résultat positif indique la présence de l'organisme cible dans une quantité d'échantillon donnée et dans la limite du seuil de détection de la technique employée. Un résultat négatif indique l'absence de l'organisme cible dans une quantité d'échantillon donnée et dans la limite du seuil de détection de la technique employée.

Ce test s'intègre dans le schéma suivant de détection et d'identification des trois espèces : CLas, CLaf et CLam.



Les laboratoires mettant en œuvre la détection des souches pathogènes provoquant la maladie du Huanglongbing doivent réaliser un test de détection basé sur un principe de biologie moléculaire : une PCR en temps réel (Li et al., 2006) à partir de l'extraction d'ADN des nervures et pétioles de feuilles. Il s'agit d'une PCR en temps réel multiplexe basée sur la technologie Taqman et associant 3 amorces « forward » (une spécifique à chacune des 3 espèces de '*Candidatus Liberibacter*' spp. responsable du HLB) et une seule amorce « reverse » commune à chacun des 3 couples ainsi qu'une sonde unique. On notera également qu'une utilisation de la PCR temps réel en simplexe est également possible pour déterminer précisément l'espèce.

Les résultats possibles sont les suivants :

- Une amplification PCR temps réel obtenue pour un $Ct \leq 36$ implique la détection de '*Candidatus Liberibacter*' spp. responsable de la maladie du Huanglongbing sur plante hôte de la famille des *Rutaceae* ;
- Une amplification PCR temps réel obtenue pour un $Ct > 36$ ou pas de Ct implique l'absence de détection de '*Candidatus Liberibacter* spp.' responsable de la maladie du Huanglongbing sur plante hôte de la famille des *Rutaceae*.

On notera que deux modalités d'extraction d'ADN sont proposées dans la méthode :

- L'extraction au kit : elle doit être privilégiée pour une recherche optimale de sensibilité analytique et est obligatoire lorsque les analyses sont faites en regroupement d'échantillons ;
- L'extraction rapide au NaOH : elle présente l'avantage d'un gain de temps et est plus économique. Elle peut être mise en œuvre pour l'obtention d'un résultat rapide ou lors de l'analyse de grandes séries d'échantillons. **Elle doit être mise en œuvre uniquement avec l'accord préalable, explicite et éclairé du demandeur d'analyse.**

5. Réactifs

Avertissement : Des appellations commerciales ou fournisseurs peuvent être mentionnées dans le descriptif des produits nécessaires à la mise en œuvre de la présente méthode. Ces informations sont données à l'intention des utilisateurs de la méthode et ne signifient nullement que l'Anses recommande l'emploi exclusif de ces produits. Des produits équivalents peuvent être utilisés s'il est démontré qu'ils conduisent aux mêmes résultats.

En règle générale, l'utilisateur doit veiller (par l'utilisation de produits et consommables certifiés, nettoyage, stérilisation ou tout autre traitement approprié) à l'absence dans l'eau, produits et consommables utilisés, de contamination (ADN ou ARN), de nucléase, d'inhibiteur ou de tout autre élément pouvant interférer sur le résultat.

Les recommandations des fournisseurs, concernant les conditions de stockage avant utilisation, seront suivies, ainsi que la conservation en cours d'utilisation. A défaut le laboratoire définira les conditions qu'il jugera optimales.

5.1 Eau

L'eau utilisée pour la préparation des tampons et solutions, ainsi que pour les étapes de préparation des échantillons doit être de qualité « analytique » (*i.e.* déminéralisée, distillée, osmosée...) garantissant d'atteindre les critères de performance attendus pour les tests.

L'eau utilisée pour les étapes de PCR temps réel (préparation des mix, dilution des amplifiats) doit présenter une qualité suffisante pour une utilisation en biologie moléculaire (eau ultrapure par exemple).

5.2 Réactifs de biologie moléculaire

Certains réactifs sont critiques et conditionnent la performance des étapes d'amplification (mastermix ou core kit commercial de polymérase thermostable, dNTP, amorces, sondes).

5.2.1 Kit d'extraction d'ADN

La présente méthode a été caractérisée et validée en extrayant et purifiant l'ADN total de l'échantillon à l'aide du kit DNeasy® Plant mini kit de Qiagen, en suivant le protocole d'extraction « Plant Tissue » du fournisseur, en commençant par l'étape décrite dans le manuel : « Déposer 400 µL de tampon AP1 et 4 µL de RNase A dans chaque tube... ».

5.2.2 Amplification moléculaire (Li *et al.*, 2006)

5.2.2.1 Master mix

Le protocole a été caractérisé et validé avec le mélange réactionnel du kit GoTaq® Probe qPCR Master Mix de Promega (Madison, WI, USA), contenant 2 µL de référence passive CXR pour un tube de 1 mL de Master Mix. Le volume d'ajout de CXR est dépendant du type de thermocycleur utilisé (voir protocole fournisseur) et doit être ajusté au matériel concerné.

5.2.2.2 Oligonucléotides

Amorces et sonde utilisées dans l'amplification moléculaire spécifique par PCR en temps réel (Li *et al.*, 2006) pour la détection de CLas, CLaf et CLam provoquant le HLB :

- HLBas 5' TCGAGCGCGTATGCAATACG 3'
- HLBaf 5' CGAGCGCGTATTTTATACGAGCG 3'
- HLBam 5' GAGCGAGTACGCAAGTACTAG 3'
- HLBr 5' GCGTTATCCCGTAGAAAAAGGTAG 3'
- HLBp 5' **FAM**-AGACGGGTGAGTAACGCG-**BHQ1** 3'

Cible amplifiée : ARN ribosomal 16S.

Les différentes amorces et sondes sont commandées avec *a minima* une méthode de purification HPLC (High Performance Liquid Chromatography).

5.3 Tampons et solutions

La liste des tampons et solutions nécessaires à la mise en œuvre de la méthode est la suivante :

- Tampon de broyage (TRIS/EDTA/SDS) (recette disponible en Annexe 1) ;
- Tampons d'extraction d'ADN (validés avec ceux du **DNeasy® Plant Mini Kit, Qiagen**) ;
- Solution d'extraction rapide NaOH 2% (m/V) (recette disponible en Annexe 1).

5.4 Conservation

Les préparations des tampons et solutions ainsi que leurs durées et conditions de conservation doivent être conformes aux recommandations du fournisseur. A défaut le laboratoire définira les conditions qu'il juge satisfaisantes.

5.5 Autres réactifs et consommables

Consommables à usage unique

- Microcônes stériles à filtre de volumes adaptés ;
- Microtubes stériles de volume adapté ;
- Microtubes, barrettes ou plaques stériles pour PCR temps réel de volume adapté au thermocycleur utilisé.

Éthanol 70% (v/v) (et éventuellement un produit détergent désinfectant de type Aniospray) : désinfection des surfaces de travail et du matériel lors des étapes de prise d'essai, de broyage et d'isolement.

Produits de décontamination de type DNA Away ou équivalent : désinfection des surfaces de travail et du matériel lors de la mise en œuvre des tests de biologie moléculaire.

Sachets de broyage avec filtre.

5.6 Contrôles et témoins

La technique de détection de régions cibles d'ADN d'un organisme par la technique de PCR en temps réel requiert 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 :

- L'opérateur a correctement suivi le protocole ;
- Les consommables et réactifs utilisés étaient de qualité suffisante ;
- Les volumes prélevés à l'aide des micropipettes, les températures et durées de réaction, la concentration et le pH des solutions utilisées étaient corrects ;
- L'extraction des souches de leurs milieu (plante ou eau) était suffisante en quantité et amplifiable (pas d'interférence avec des composés inhibiteurs) ;
- Il n'y a pas eu de contamination accidentelle des échantillons testés.

Conformément aux exigences de la méthode d'analyse MOA 022, les témoins à intégrer dans le test de PCR en temps réel pour la détection du HLB sur plantes hôtes de la famille des Rutaceae sont les suivants :

- Un **témoin négatif de processus** (E-) : matrice (nervures et pétioles de feuilles ou feuilles entières) ne contenant pas l'organisme, traitée dans les mêmes conditions que les échantillons à analyser, déclarée non contaminée à l'issue de la manipulation.
- Un **témoin positif de processus** (E+) : matrice (nervures et pétioles de feuilles infectées ou feuilles entières infectées) contenant l'organisme cible (une des trois espèces cibles de '*Candidatus Liberibacter spp.*' provoquant la maladie du Huanglongbing), traitée dans les mêmes conditions que les échantillons à analyser, déclarée contaminée à l'issue de la manipulation. Il donne au minimum l'assurance d'un déroulement correct de la manipulation.

Pour chaque série d'analyses, on peut utiliser un échantillon de référence naturellement ou artificiellement contaminé.

- Un **témoin négatif de PCR (A-)** : il contient tous les éléments du mélange réactionnel mais aucun extrait d'ADN n'est ajouté, uniquement de l'eau ; cela permet de vérifier l'absence de contamination au cours de la réaction de PCR.
- Un **témoin positif de PCR (A+)** (il s'agit d'un témoin de PCR contenant la séquence d'ADN cible de CLas, CLaf ou CLam). Un seul témoin positif de PCR est nécessaire pour la validation de l'amplification moléculaire. Ce type de témoin n'est pas obligatoire mais est conseillé en complément du témoin positif de processus. Il peut notamment être préparé à une concentration proche du seuil de détection afin de permettre la détection de petites anomalies de déroulement du test, susceptibles d'entraîner la non-détection d'échantillons faiblement infectés.

Les témoins de processus doivent faire l'objet de deux puits PCR. Les témoins de PCR peuvent faire l'objet d'un puits unique. D'autres ADN issus de collections internationales ou du laboratoire, préalablement vérifiés en test moléculaire peuvent également être utilisés comme témoins de référence.

6. Appareillage et matériels

Avertissement : Des appellations commerciales ou fournisseurs peuvent être mentionnés dans le descriptif des appareils et matériels nécessaires à la mise en œuvre de la présente méthode. Cette information est donnée à l'intention des utilisateurs de la méthode et ne signifie nullement que l'Anses recommande l'emploi exclusif de ces matériels. Des matériels équivalents peuvent être utilisés s'il est démontré qu'ils conduisent aux mêmes résultats.

Pour la mise en œuvre de cette méthode, le laboratoire disposera des appareils décrits dans la méthode officielle d'analyse MOA 022. Différents systèmes peuvent être utilisés, en fonction de l'appareillage disponible au laboratoire.

Afin d'alléger la lecture de la méthode, 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 de la méthode).

Grandeur	EMT
Volume	Volume < 10 mL : EMT = ± 10% Volume ≥ 10 mL : EMT = ± 5%
Masse	EMT = ± 10%
pH	EMT = ± 0,3 unité pH

Grandeur	EMT
Température	Incubateur : EMT = $\pm 3^{\circ}\text{C}$ Réfrigérateur : 5°C et EMT = $\pm 4^{\circ}\text{C}$ Congélateur : $\leq -18^{\circ}\text{C}$ Congélateur froid intense : $\leq -65^{\circ}\text{C}$ Bain thermostaté : EMT = $\pm 3^{\circ}\text{C}$ Thermocycleur* : EMT justesse = $\pm 1^{\circ}\text{C}$; EMT homogénéité = $\pm 2^{\circ}\text{C}$
Temps	EMT = $\pm 10\%$

*Un test biologique (mis en œuvre selon les préconisations de la MOA022) peut venir compléter ou se substituer à la vérification métrologique des thermocycleurs.

6.1 Broyeur

Cette méthode a été validée en utilisant un broyeur à billes (de type « Homex© » modèle 6 de Bioreba) avec broyage de l'échantillon dans un sachet de broyage en polyéthylène, muni d'une gaze de filtration à mailles en nylon. Le broyat peut alors être récupéré directement dans le sachet. Tout autre système de broyage peut être utilisé, pourvu qu'il permette d'obtenir une qualité de broyage équivalente et limite les risques de contaminations croisées.

6.2 Thermocycleur pour PCR temps réel

Le protocole a été évalué sur thermocycleur QuantStudio 5 Real-Time PCR System (ThermoFisher Scientific). D'autres thermocycleurs permettant d'obtenir des résultats équivalents peuvent être utilisés.

7 Échantillons

7.1 Conditions d'acceptation des échantillons à réception

Pour les analyses sur plante hôte de la famille des *Rutaceae*, le laboratoire réalise l'analyse à partir d'une prise d'essai de 1 g de matériel végétal frais ou 0,35 g de matériel végétal lyophilisé ; en dessous de cette quantité de matériel végétal, des réserves sont émises quant au résultat d'analyse si ce dernier est négatif. Les nervures et pétioles pour analyse doivent arriver au laboratoire dans un état de fraîcheur approprié, non altérées par une décomposition des tissus ou autre. Les échantillons peuvent être sous forme de tissus frais ou lyophilisés, en feuilles entières ou en nervures et pétioles excisés.

Dans le cas contraire, le laboratoire émet des réserves sur tout résultat d'analyse négatif en précisant l'état inapproprié de l'échantillon à la réception au laboratoire. Si les échantillons arrivent dans un état trop dégradé, le laboratoire peut refuser l'analyse. Le refus d'analyse doit être motivé et doit être notifié au client dans les plus brefs délais.

Le traitement individuel des échantillons doit être privilégié, notamment en présence d'échantillons asymptomatiques. Le regroupement par lot peut avoir des conséquences sur la sensibilité analytique de la méthode, ce mode d'analyse doit donc être choisi en connaissance de cause par le client. Il doit être mis en œuvre uniquement **avec l'accord préalable, explicite et éclairé du demandeur d'analyse** qui doit lui-même définir la conduite à tenir en cas de résultat positif sur le lot (par exemple, refaire une analyse individuelle).

7.2 Conservation des échantillons avant analyse

Le délai entre la réception de l'échantillon et le début effectif de l'analyse doit être le plus court possible ; il doit être de préférence inférieur à 7 jours pour les échantillons végétaux frais et ne doit pas dépasser 14 jours pour ces échantillons à conditions qu'aucune dégradation ne soit observée. Pour les échantillons lyophilisés, ce délai peut être allongé à 1 mois. L'échantillon, frais ou lyophilisé, devra pendant ce temps être conservé au sec à une température de +5°C.

7.3 Conservation des échantillons après analyse

Les laboratoires doivent conserver les reliquats pertinents (nature, quantité et qualité) de matériel soumis à analyse, dans des conditions appropriées garantissant leur intégrité (cf. tableau ci-après), jusqu'à au moins le quinzième jour calendaire suivant l'envoi au demandeur du rapport d'analyse. Dans le cas d'un résultat autre que négatif, ce délai est prolongé à 12 mois pour les reliquats qui le permettent selon les modalités détaillées dans le tableau ci-après.

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 ou une analyse de confirmation.

Étapes	Type de reliquat	Conservation		Modalités d'envoi à un autre laboratoire le cas échéant
		Conditions	Durée	
Prise d'essai sur plante	Nervures et pétioles <u>frais</u>	+5°C	Tout résultat : 15 jours après envoi du rapport	Conditionnements hermétiques clairement identifiés Température ambiante Transporteur express avec suivi
	Nervures et pétioles <u>lyophilisés</u>	Ambiante ou +5°C ou -18°C		
Identification PCR	ADN extraits	-18°C	Résultat positif : 12 mois	

8 Mode opératoire

8.1 Préparation des échantillons pour analyse

Un échantillon réceptionné pour analyse est constitué d'environ 15 feuilles ou nervures et pétioles en bon état de conservation (absence de nécroses ou d'oxydation) de plantes hôtes de la famille des *Rutaceae* susceptibles de contenir l'organisme cible dans ses vascularités. Ces 15 feuilles doivent permettre de constituer une prise d'essai d'au moins 1 g de nervures et pétioles pour les échantillons frais ou 0,35 g de nervures et pétioles pour les échantillons lyophilisés. Cependant, dans le cas d'arbre très jeunes, le prélèvement de 15 feuilles n'est parfois pas réalisable et il est alors conseillé d'en prendre un nombre le plus proche possible de 15 feuilles, pour une masse proche de 1 g de nervures et pétioles pour les échantillons frais ou proche de 0,35 g de nervures et pétioles pour les échantillons lyophilisés.

La prise d'essai se fait en une seule fois, que l'échantillon soit symptomatique ou asymptomatique.

La prise d'essai est réalisée en trois étapes :

1. La prise d'essai est faite sur le pétiole et la nervure principale des feuilles en les excisant avec un scalpel ; si la quantité de matériel végétal est insuffisante la prise d'essai peut être complétée par des fragments de limbe. Prélever préférentiellement des fragments de nervures correspondant aux deux premiers tiers de leur longueur en partant du pétiole. Ces nervures et pétioles sont découpées en tronçons et homogénéisées, afin que l'étape de prise d'essai se réalise sur la totalité des nervures et pétioles prélevées ;
2. Pour des échantillons réceptionnés frais : prélever 1 g de nervures et pétioles ; pour des échantillons réceptionnés lyophilisés : prélever 0,35 g de nervures et pétioles ;
3. Les prises d'essai sont placées dans des sachets de broyage adaptés au type de broyeur (ex HOMEX 6). Ajouter 5 mL (ou adapter la quantité de tampon ou de solution au ratio 1/5 en cas de quantité différente de 1 g) de tampon de broyage TRIS/EDTA/SDS (Annexe 1) pour une extraction ultérieure en kit des acides nucléiques ; ou de solution d'extraction rapide NaOH 2% (Annexe 1). Pour permettre la réhydratation des nervures et pétioles lyophilisées, laisser reposer les sachets pendant 10 min environ avant de procéder à l'étape de broyage et de centrifugation.

Notes générales :

Entre chaque prise d'essai, l'utilisateur veillera à désinfecter le matériel utilisé pour les prélèvements.

Suite à la prise d'essai, les reliquats de matériel végétal sont conservés selon les modalités indiquées précédemment.

Regroupement d'échantillons : Les échantillons pourront être regroupés jusqu'à 10 dans un même broyage, en veillant à l'homogénéisation du pooling et en accordant proportionnellement la quantité de tampon. Exemple : pour 10 échantillons regroupés, 8 à 10 g pourront être prélevés pour un volume de 40 à 50 mL de tampon de broyage à ajuster selon la masse exactement prélevée. Le résultat de l'analyse ne donnera alors qu'une seule réponse pour l'ensemble des échantillons regroupés.

8.2 Broyage de l'échantillon végétal

L'utilisation d'un broyeur à bille est recommandée (type HOMEX 6). Toutefois, toute autre méthode de broyage permettant d'obtenir des résultats équivalents peut également être utilisée. Un temps d'attente de 10 min environ après broyage est nécessaire pour un rendement optimal de souches cibles. A l'issue de cette étape, transférer 2 mL (minimum 1 mL) de broyat dans un microtube de 2 mL afin de réaliser les étapes ultérieures.

8.3 Extraction d'ADN en kit

A l'issue du broyage TRIS/EDTA/SDS (Annexe 1) et de la phase de libération, les échantillons sont centrifugés à environ 20 000 g pendant environ 10 min, afin de précipiter toutes les cellules cibles. Les échantillons sont centrifugés à température ambiante ou légèrement réfrigérée pour assurer la tenue du culot. Jeter le surnageant et poursuivre les étapes ultérieures d'extraction d'ADN.

Remarque : dans le cas d'un traitement différé de l'échantillon centrifugé, une fois le surnageant jeté il est possible de conserver les échantillons à une température $\leq -18^{\circ}\text{C}$ pendant plusieurs semaines en attente de l'extraction.

L'extraction d'ADN est réalisée avec le kit commercial : DNeasy® Plant mini Kit, selon les recommandations du fournisseur (Qiagen). Le protocole ayant été évalué avec ce kit précis et s'agissant d'un réactif critique, l'utilisation d'un autre kit d'extraction ou d'une autre méthode d'extraction est assujettie à l'accord du LNR ou à un dispositif de validation de méthodes.

La première étape s'effectue sur le culot issu de l'étape précédente.

Les extraits d'ADN peuvent être conservés plusieurs semaines, à une température $\leq -18^{\circ}\text{C}$, en attente de la réalisation de l'amplification.

8.4 Extraction rapide au NaOH

A l'issue du broyage au NaOH 2% (m/V) (recette disponible en Annexe 1) et de la phase de libération, les échantillons sont centrifugés pendant quelques secondes (centrifugation de type « short spin » avec centrifugeuse de paillasse ou équivalent) pour permettre de précipiter les plus gros débris végétaux pouvant empêcher un pipetage adéquat. Le surnageant constitue la fraction à prélever pour l'amplification moléculaire ; et peut être conservé plusieurs semaines, à une température $\leq -18^{\circ}\text{C}$, en attente de la réalisation de l'amplification.

Une dilution au 1/50^e est nécessaire pour la réalisation de l'amplification moléculaire. Cette dilution ne pourra pas être conservée comme reliquat d'analyse. Une prise d'essai de minimum 2 μL sera réalisée dans la solution mère pour effectuer cette dilution.

8.5 Test spécifique de détection par PCR en temps réel (Li et al., 2006)

Amplifier deux puits PCR par prise d'essai pour les échantillons et les différents témoins. Les contrôles décrits doivent être introduits pour chaque série d'échantillons analysés en simultanément.

8.5.1 Préparation du mélange réactionnel en multiplex

Réactifs	[Ci]	[Cf]	Volume par puits (µL)
Eau	/	/	3,005
Primer HLBas	10 µmol/L	0,25 µmol/L	0,325
Primer HLBaf	10 µmol/L	0,25 µmol/L	0,325
Primer HLBam	10 µmol/L	0,25 µmol/L	0,325
Primer HLBr	10 µmol/L	0,25 µmol/L	0,325
Sonde HLBp	10 µmol/L	0,15 µmol/L	0,195
GoTaq® Probe qPCR Master Mix (Promega) avec CXR	2 X	1 X	6,500
ADN	/	/	2,000
Total			13,000

[Ci] : Concentration des solutions mères ; [Cf] : concentration finale dans le mix réactionnel ; Volume par puits (µL) : volume final pour les concentrations de solutions mères données.

Remarques :

- Le volume final est de 13 µL dans chaque puits soit 11 µL de mélange réactionnel et 2 µL d'ADN ou d'eau (dans le cadre du témoin négatif de PCR) ;
- Établir soigneusement le plan de distribution (plan de plaque ou équivalent) et d'identification des extraits. Chaque échantillon et témoin de processus est déposé deux fois soit deux puits par échantillon. Les témoins d'amplification peuvent ne faire l'objet que d'un seul puits.
- Afin de caractériser l'espèce de 'Candidatus Liberibacter spp.' présente dans un échantillon positif, il est possible d'utiliser la méthode en simplex en préparant un mélange réactionnel contenant la sonde HLBp, l'amorce HLBr, ainsi que l'une des amorces spécifiques HLBas, HLBaf ou HLBam (voir ci-dessous).

8.5.2 Préparation du mélange réactionnel en simplex

Réactifs	[Ci]	[Cf]	Volume par puits
Eau	/	/	3,655
Primer HLBas ou HLBaf ou HLBam	10 µmol/L	0,25 µmol/L	0,325
Primer HLBr	10 µmol/L	0,25 µmol/L	0,325
Sonde HLBp	10 µmol/L	0,15 µmol/L	0,195
GoTaq® Probe qPCR Master Mix (Promega) avec CXR	2 X	1 X	6,500
ADN	/	/	2,000
Total			13,000

[Ci] : Concentration des solutions mères ; [Cf] : concentration finale dans le mix réactionnel ; Volume par puits (µL) : volume final pour les concentrations de solutions mères données.

Remarques : Voir remarques du 8.5.1

8.5.3 Cycles thermiques PCR temps réel

Étapes	Température (°C)	Durée	Cycles
Dénaturation initiale	95	10 min	
Dénaturation	95	15 s	40
Hybridation / Elongation *	58	1 min	

* la mesure de fluorescence se fait à l'issue de cette étape et à chaque cycle

8.6 Analyse des résultats

Le seuil d'amplification (threshold) peut être automatiquement attribué par le logiciel QuantStudio™ Design & Analysis (ThermoFisher Scientific) ou tout autre logiciel comparable pour l'analyse de données. Selon le type de thermocycleur et de logiciel utilisés, il est possible de retenir d'autres règles pour la détermination de la ligne de seuil. La normalisation des signaux de fluorescence est conseillée en utilisant la fluorescence interne passive CXR (ROX) contenue dans les Master Mix PCR temps réels.

9 Résultats

9.1 Contrôle qualité

La vérification de la conformité à l'attendu pour les témoins est un préalable à l'interprétation des résultats des échantillons soumis à analyse. Les résultats attendus pour les témoins utilisés dans chaque test sont décrits dans les paragraphes ci-après.

L'analyse par PCR en temps réel est validée si les conditions ci-dessous sont vérifiées :

Type de contrôle	Résultats attendus		
	Puits 1	Puits 2	Final
Témoin négatif de processus (E-)	-	-	NÉGATIF
Témoin positif de processus (E+)	+	+	POSITIF
Témoin négatif de PCR (A-)	-	(-)*	NÉGATIF
Témoin positif de PCR (A+)	+	(+)*	POSITIF

*La duplication de ces témoins est facultative.

Dans le cas où une ou plusieurs conditions ne seraient pas respectées, l'analyse n'est pas validée et selon le type d'anomalie observée, tout ou partie de l'analyse est à refaire (MOA 022).

9.2 Calculs et expression des résultats

9.2.1 Test spécifique de détection par PCR en temps réel

Le résultat d'un puits PCR est positif pour la détection de '*Candidatus Liberibacter*' spp. responsable de la maladie du HLB s'il présente une courbe de fluorescence exponentielle, présentant une intersection avec la ligne seuil et un Ct \leq 36.

Le résultat d'un puits PCR est négatif s'il ne présente pas de courbe de fluorescence ou s'il ne présente pas de Ct ou s'il présente une courbe non exponentielle ou s'il présente une courbe présentant une intersection avec la ligne seuil et un Ct $>$ 36.

Les résultats s'interprètent de la manière suivante :

Analyses		Résultat	Interprétation
Puits 1	Puits 2		
+	+	POSITIF	Test positif
+	-	PCR temps réel à refaire <i>si à nouveau au moins 1 positif sur 2, le test est interprété comme positif</i>	
-	-	NÉGATIF	Test négatif

9.2.2 Formulation des résultats de biologie moléculaire

La formulation des résultats sur le rapport d'analyse peut se faire de la façon suivante :

Résultat négatif : '*Candidatus Liberibacter* spp.' provoquant la maladie du Huanglongbing non détecté dans l'échantillon XXX par la méthode ANSES/LSV/MA063

Résultat positif : '*Candidatus Liberibacter* spp.' provoquant la maladie du Huanglongbing détecté dans l'échantillon XXX par la méthode ANSES/LSV/MA063.

10 Caractéristiques de performance de la méthode pour la détection de 'Candidatus Liberibacter asiaticus' (Extraction Kit)

D'après le rapport de caractérisation et de validation de la méthode de détection par PCR temps réel sur feuilles de 'Candidatus Liberibacter spp.' provoquant le Huanglongbing sur plantes hôtes de la famille des *Rutaceae* (document de référence [3]).

Caractéristique	Paramètre	Valeur obtenue à l'issue de la caractérisation	Modalités de caractérisation
Sensibilité	Pourcentage d'échantillons détectés parmi les échantillons cibles	91,7%	12 échantillons cibles testés sur 2 puits et répétés 3 fois, représentatifs de la diversité géographique, génétique et de plantes hôtes
Spécificité	Pourcentage d'échantillons non détectés parmi les échantillons non-cibles	100%	14 échantillons non-cibles testés sur 2 puits et répétés 3 fois, représentatifs de la diversité géographique, génétique et de plantes hôtes
Exactitude	Pourcentage de vrais positifs et de vrais négatifs parmi des échantillons cibles et des échantillons non-cibles	95,9%	26 échantillons cibles et non cibles testés sur 2 puits et répétés 3 fois.
Seuil de détection	Niveau de concentration le plus bas pour lequel tous les résultats (100%) sont positifs	$6,4 \cdot 10^{-4}$	5 échantillons cibles testés sur 2 puits et répétés 3 fois, sur 6 niveaux de dilution : (10^0 , 10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3} , 10^{-4} et 10^{-5})
Répétabilité	Pourcentage d'accords entre réplicats d'un même échantillon.	94,4%	12 échantillons testés sur 2 puits et répétés 3 fois

11 Caractéristiques de performance de la méthode pour la détection de '*Candidatus Liberibacter africanus*' (Extraction Kit)

D'après le rapport de caractérisation et de validation de la méthode de détection par PCR temps réel sur feuilles de '*Candidatus Liberibacter spp.*' provoquant le Huanglongbing sur plantes hôtes de la famille des *Rutaceae* (document de référence [3]).

Caractéristique	Paramètre	Valeur obtenue à l'issue de la caractérisation	Modalités de caractérisation
Sensibilité	Pourcentage d'échantillons détectés parmi les échantillons cibles	93,3%	5 échantillons cibles testés sur 2 puits et répétés 3 fois, représentatifs de la diversité géographique, génétique et de plantes hôtes
Spécificité	Pourcentage d'échantillons non détectés parmi les échantillons non-cibles	100%	14 échantillons non-cibles testés sur 2 puits et répétés 3 fois, représentatifs de la diversité géographique, génétique et de plantes hôtes
Exactitude	Pourcentage de vrais positifs et de vrais négatifs parmi des échantillons cibles et des échantillons non-cibles	96,7%	19 échantillons cibles et non cibles testés sur 2 puits et répétés 3 fois
Seuil de détection	Niveau de concentration le plus bas pour lequel tous les résultats (100%) sont positifs	$5,5 \cdot 10^{-3}$	2 échantillons cibles testés sur 2 puits et répétés 3 fois, sur 6 niveaux de dilution : (10^0 , 10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3} , 10^{-4} et 10^{-5})
Répétabilité	Pourcentage d'accords entre réplicats d'un même échantillon.	86,7%	5 échantillons testés sur 2 puits et répétés 3 fois

12 Caractéristiques de performance de la méthode pour la détection de '*Candidatus Liberibacter americanus*' (Extraction Kit)

D'après le rapport de caractérisation et de validation de la méthode de détection par PCR temps réel sur feuilles de '*Candidatus Liberibacter spp.*' provoquant le Huanglongbing sur plantes hôtes de la famille des *Rutaceae* (document de référence [3]).

Ces résultats sont partiels du fait d'une disponibilité limitée des échantillons d'ADN de CLam.

Caractéristique	Paramètre	Valeur obtenue à l'issue de la caractérisation	Modalités de caractérisation
Sensibilité	Pourcentage d'échantillons détectés parmi les échantillons cibles	100%	2 échantillons cibles testés sur 2 puits et répétés 3 fois
Spécificité	Pourcentage d'échantillons non détectés parmi les échantillons non-cibles	100%	14 échantillons non-cibles testés sur 2 puits et répétés 3 fois, représentatifs de la diversité géographique, génétique et de plantes hôtes
Exactitude	Pourcentage de vrais positifs et de vrais négatifs parmi des échantillons cibles et des échantillons non-cibles	100%	2 échantillons cibles et non cibles testés sur 2 puits et répétés 3 fois
Seuil de détection	Niveau de concentration le plus bas pour lequel tous les résultats (100%) sont positifs	$5,5 \cdot 10^{-1}$	2 échantillons cibles testés sur 2 puits et répétés 3 fois, sur 6 niveaux de dilution : (10^0 , 10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3} , 10^{-4} et 10^{-5})
Répétabilité	Pourcentage d'accords entre réplicats d'un même échantillon.	100%	2 échantillons testés sur 2 puits et répétés 3 fois

Annexe 1 - Recettes

Tampon TRIS - EDTA - SDS (pH = 8,0)

La composition du tampon de broyage TRIS pour 1L est la suivante :

Composants	Masse Molaire (g/mol)	Concentration finale	Masse (g)
Tris(hydroxyméthyl)aminométhane NH₂C(CH₂OH)₃ [TRIS Sigma 7-9, par exemple]	121,135	50 mmol/L	6,06
Acide Éthylène Diamine Tétraacétique C ₁₀ H ₁₆ N ₂ O ₈ (EDTA)	292,243	5 mmol/L	1,46
Dodécylsulfate de sodium NaC ₁₂ H ₂₅ SO ₄ (SDS)	288,379	1% (m/v)	10,00
Eau distillée			Qsp 1 L

Étapes de fabrication :

- Peser les composants indépendamment et les mettre en solution dans une fraction d'eau distillée, nettement inférieure au volume final préparé ;
- Fabriquer le tampon de broyage en réunissant les trois composants (TRIS/EDTA/SDS) et ajuster au volume désiré avec de l'eau distillée ou de qualité supérieure, en tenant compte de la masse de chaque composant ;
- Contrôler le pH et ajuster si nécessaire à 8,0 ;
- Autoclaver le tampon pour une conservation à l'état réfrigéré.

N'utilisez le tampon de broyage qu'à température ambiante et le conserver à +5°C pour une durée maximale de 2 mois. Le laboratoire peut utiliser d'autres moyens de conservation (à l'état congelé par exemple) sous réserve que les performances restent démontrées.

Remarque 1 : la dissolution de certains éléments dans de l'eau peut s'avérer difficile dans les conditions normales de pression, température et de force ionique neutre ; il est recommandé de dissoudre l'EDTA dans un pH basique et le SDS à une température d'environ +35°C (passage de quelques secondes aux micro-ondes).

Remarque 2 : la conservation du tampon à une température de +5°C peut entraîner une précipitation en paillettes de certains des composants. Avant toute utilisation, le laisser à température ambiante jusqu'à disparition totale du précipité (environ 45 min à environ 20°C pour 500 mL).

Solution NaOH 2% (m/V)

La composition de la solution d'extraction rapide NaOH 2% (m/V) pour **1L** est la suivante :

Composants	Masse Molaire (g/mol)	Concentration finale	Masse (g)
NaOH	39,997	2%	20
		Eau distillée	Qsp 1 L

Étapes de fabrication :

- Peser le NaOH et le dissoudre dans la quantité d'eau distillée correspondante.

N'utilisez la solution d'extraction rapide qu'à température ambiante et la conserver à température ambiante pour une durée maximale de 1 mois.

Remarque : en raison du pH très élevé de la solution, le laboratoire prendra les mesures de sécurité qu'il juge adéquates lors de sa fabrication, de son stockage, de son utilisation et de la gestion des déchets.

Bibliographie

- Bové, J.M. (2006). Huanglongbing: a destructive, newly-emerging, century-old disease of citrus. *Journal of Plant Pathology* 88, 7-37.
- Gottwald, T.R. (2010). Current epidemiological understanding of citrus Huanglongbing. *Annual Review of Phytopathology* 48, 119-139.
- Li, W., Hartung, J.S., and Levy, L. (2006). Quantitative real-time PCR for detection and identification of *Candidatus Liberibacter* species associated with citrus huanglongbing. *Journal of Microbiological Methods* 66, 104-115.
- Li, W., Levy, L., and Hartung, J.S. (2009). Quantitative distribution of '*Candidatus Liberibacter asiaticus*' in citrus plants with citrus huanglongbing. *Phytopathology* 99, 139-144.
- Tatineni, S., Sagaram, U.S., Gowda, S., Robertson, C.J., Dawson, W.O., Iwanami, T., et al. (2008). *In planta* distribution of '*Candidatus Liberibacter asiaticus*' as revealed by polymerase chain reaction (PCR) and real-time PCR. *Phytopathology* 98, 592-599.
- Teixeira, D.C., Luc Danet, J., Eveillard, S., Cristina Martins, E., de Jesus Junior, W.C., Takao Yamamoto, P., et al. (2005). Citrus huanglongbing in Sao Paulo State, Brazil: PCR detection of the '*Candidatus*' *Liberibacter* species associated with the disease. *Molecular and Cellular Probes* 19, 173-179.