



**Détection sur feuilles de Candidatus
Liberibacter spp.
provoquant le HUANGLONGBING
sur plantes hôtes de la famille des
*Rutaceae***

METHODE OFFICIELLE D'ANALYSE



Droits de reproduction et Copyright

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

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

Dates de validité du présent document

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

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

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

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

MOA 033 Numéro de la version	Consultation publique		Validité	
	Début	Fin	Début	Fin
MOA 033 version 1a	Juillet 2013	août 2013	Octobre 2013	Décembre 2014 + 6 mois ¹
MOA 033 version 1b	x	x	Décembre 2014	

¹ Les modifications apportées étant mineures, le délai est ramené à 6 mois à compter de l’officialisation de la version 1b

SOMMAIRE

SOMMAIRE	3
Table des illustrations	4
PRÉAMBULE	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	6
Considérations d'ordre métrologique	6
Obligations réglementaires et limites de responsabilité	7
Revue des méthodes officielles, amendement et modification.....	7
ORIGINE DE LA METHODE	8
PRINCIPALES MODIFICATIONS PAR RAPPORT A LA VERSION PRECEDENTE	9
Modifications	9
Améliorations.....	9
DESCRIPTION DE LA METHODE	10
1. Introduction	10
2. Objet	11
3. Domaine d'application	11
4. Présentation schématique de la détection	12
5. Produits et consommables	13
5.1. Milieux et solutions	13
5.1.1. Réactifs de biologie moléculaire	13
5.1.2. Tampons	14
5.2. Oligonucléotides	14
5.3. Autres consommables	14
6. Appareillage et matériel	15
7. Contrôles et témoins	15
8. Étapes de l'analyse	16
8.1. Prise d'analyse	16
8.2. Broyage et concentration	17
8.3. Extraction d'ADN	17
8.4. Étape optionnelle de concentration de l'ADN extrait	17

8.5. Amplification des séquences cibles par PCR.....	18
8.5.1. Préparation du mélange réactionnel	18
8.5.2. Dépôt des ADN.....	18
8.5.3. Cycles thermiques PCR	19
8.6. Électrophorèse et révélation	19
8.7. Résultats	20
8.7.1. Analyse et interprétation des résultats	20
8.7.2. Formulation des résultats	21
9. Analyses de confirmation	21
10. Élimination des matériels susceptibles d'être contaminants	22
11. Conservation des reliquats de matériels utilisés	22
REMERCIEMENTS.....	23
LISTE DES DOCUMENTS OFFICIELS APPELES PAR LA METHODE.....	23
ANNEXE 1 - Composition du tampon de broyage TRIS/EDTA/SDS.....	24
BIBLIOGRAPHIE SUCCINCTE.....	25

TABLE DES ILLUSTRATIONS

<i>Figure 1 - Schéma de détection de Candidatus Liberibacter spp. provoquant la maladie du Huanglongbing sur plantes hôtes de la famille des Rutaceae.....</i>	<i>12</i>
<i>Tableau 1 - Mix réactionnel pour la PCR de détection des souches responsables de la maladie du Huanglongbing sur plantes hôtes de la famille des Rutaceae</i>	<i>18</i>
<i>Tableau 2 - Cycle PCR pour la détection des souches responsables de la maladie du Huanglongbing sur plantes hôtes de la famille des Rutaceae.....</i>	<i>19</i>
<i>Tableau 3 - Matrice de décision pour l'interprétation des résultats des contrôles PCR</i>	<i>20</i>
<i>Tableau 4 - Matrice de décision pour l'interprétation des résultats d'analyse</i>	<i>20</i>
<i>Tableau 5 - Formulation des résultats d'amplification PCR</i>	<i>21</i>

PRÉAMBULE

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 ÉCHANTILLON

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 est un réactif directement impliqué dans la reconnaissance des organismes recherchés.

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.

Toutes autres modifications (qui n'a pas d'incidence prévisible sur le résultat) doivent 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. 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
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-clés utilisés sont susceptibles de modifier la qualité des résultats obtenus avec les méthodes officielles. Ces deux derniers aspects relèvent de la responsabilité des laboratoires utilisateurs.

Le ministère chargé de l'agriculture ne saurait être tenu pour responsable dans le cas de mises en œuvre inadéquates, volontaires ou non des méthodes officielles.

REVUE DES METHODES OFFICIELLES, AMENDEMENT ET MODIFICATION

Une consultation publique est organisée en tant que de besoin avant la publication des méthodes officielles. Le document de travail est mis à disposition sur le site du ministère en charge de l'agriculture pendant une période de deux mois, au cours de laquelle les visiteurs sont invités à faire connaître leurs remarques, commentaires et suggestion et à signaler toute erreur, omission ou imprécision.

Les méthodes officielles sont par ailleurs revues périodiquement à l'initiative du ministère chargé de l'agriculture ou du laboratoire national de référence. A chaque modification, le code de la méthode change comme indiqué au chapitre « principales modifications par rapport à la version précédente ».

Les usagers sont également invités à faire connaître dans les meilleurs délais leurs remarques, commentaires et suggestions, et à signaler toute erreur, omission ou imprécision constatées.

ORIGINE DE LA METHODE

La présente méthode a été élaborée à partir du protocole proposé par l'Inra de Bordeaux pour la détection des trois espèces de *Candidatus Liberibacter* responsables de la maladie du Huanglongbing sur *Rutaceae*.

La méthode a pour source les recherches de Hocquellet et coll. (1999) sur les espèces *Candidatus Liberibacter asiaticus* et *africanus* ; et plus tard de Teixeira et coll. (2005) sur l'espèce nouvellement décrite : *Candidatus Liberibacter americanus*. Par ailleurs, la communauté scientifique traite de cette méthode de façon étendue. La présente méthode intègre cependant différentes modifications pour permettre une utilisation en routine :

- La méthode d'extraction d'ADN au CTAB/Phénol/Chloroforme a été remplacée par une extraction en kit commercial, DNeasy Plant Mini Kit, Qiagen ;
- Modifications sur l'amplification moléculaire par optimisation du volume final à 25 µL et augmentation du volume d'échantillon testé à 2 µL.

La méthode a été validée sur l'espèce *Candidatus Liberibacter asiaticus* dans un premier temps et a été évaluée et rédigée par l'unité « Ravageurs et agents pathogènes tropicaux » (RAPT), du Laboratoire de la santé des végétaux.

Dans un second temps, la méthode a été évaluée sur les espèces *Candidatus Liberibacter africanus* et *americanus* et rédigée par l'unité « Ravageurs et agents pathogènes tropicaux » (RAPT), du Laboratoire de la santé des végétaux.

La présente méthode permet la détection sur feuilles de *Candidatus Liberibacter asiaticus*, *Candidatus Liberibacter africanus* et *Candidatus Liberibacter americanus* provoquant le Huanglongbing sur plantes hôtes de la famille des *Rutaceae*.

PRINCIPALES MODIFICATIONS PAR RAPPORT A LA VERSION PRECEDENTE

Une modification concerne des parties clés ou le fond même de la méthode officielle, dont la prise en compte est susceptible d'améliorer significativement la portée ou le résultat de la méthode d'analyse. Sa prise en compte peut nécessiter des adaptations importantes, c'est pourquoi un délai est en règle générale accordé pour que les laboratoires de référence, agréés ou officiellement reconnus l'intègrent dans leur processus d'analyses. Dans certains cas, clairement précisés, une modification peut nécessiter une prise en compte immédiate par les laboratoires. En cas de modification majeure, le numéro de version est incrémenté d'une unité (exemple: la version v1c devient v2a). La méthode ainsi modifiée est considérée comme une nouvelle méthode.

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

MODIFICATIONS

- Le schéma de détection a été revu afin de prendre en compte la possibilité de détection des trois espèces de *Candidatus liberibacter* spp. responsables du Huanglongbing.
- La formulation des résultats de ce nouveau schéma prend en compte la difficulté de discrimination par la technique de PCR des espèces *asiaticus* et *africanus*, du fait d'une proximité de taille des bandes d'amplification.

AMELIORATIONS

- Plusieurs corrections de forme et de coquilles typographiques ont été réalisées.
- Des précisions ont été apportées au §8.5 « Amplification des séquences cibles par PCR » : il est ajouté la possibilité d'utiliser le mélange réactionnel du kit Gotaq® G2 Hot Start Polymerase de Promega (en remplacement du kit Gotaq® Hot Start Polymerase de Promega).

DESCRIPTION DE LA METHODE

Détection sur feuilles de *Candidatus Liberibacter* spp. provoquant le Huanglongbing sur plantes hôtes de la famille des *Rutaceae*.

Cette méthode est liée à la méthode officielle d'analyse MOA 022 « Techniques qualitatives d'amplification enzymatique des acides nucléiques » : elle ne peut être appliquée qu'en respectant les préconisations de cette méthode officielle.

1. Introduction

Contexte réglementaire :

Candidatus Liberibacter spp. provoque la maladie du Huanglongbing sur des plantes hôtes de la famille des *Rutaceae*. Il est considéré comme un organisme de quarantaine dans de nombreux pays (USA) et notamment au niveau de l'Union Européenne, où l'organisme est inscrit dans la directive 2000/29/CE du 8 mai 2000, annexe II partie A chapitre I. Au niveau de l'OEPP, deux des trois espèces sont inscrites sur la liste A1: *Ca. L. africanus* et *Ca. L. asiaticus*, ainsi que les psylles vecteurs : *Diaphorina citri* (A1) et *Trioza erythrae* (A2). L'espèce *Ca. L. americanus* n'est pour le moment pas répertoriée du fait de sa récente apparition (2005) et de sa faible présence dans le monde. Cependant, ces trois espèces présentent un risque majeur pour la filière agrumicole en Europe.

Pour ce qui est des départements d'outre mer, ces trois espèces sont citées dans l'arrêté du 3 septembre 1990 modifié par l'arrêté du 3 décembre 1991 (annexes DOM) Annexe II B ; liste complémentaire des organismes nuisibles dont l'introduction est interdite dans les départements d'outre-mer s'ils se présentent sur certains végétaux et produits végétaux (Guadeloupe, Guyane, Martinique, Réunion). Pour l'île de la Réunion, ces espèces figurent dans l'arrêté préfectoral N°2011-001479 annexe II chapitre II : organismes nuisibles présents sur le territoire de l'île de la Réunion et dont la dissémination doit être limitée.

Présentation de *Candidatus Liberibacter*

Candidatus Liberibacter spp. regroupe plusieurs espèces de bactéries du phloème non 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 :

- *Candidatus Liberibacter asiaticus* (Las) ;
- *Candidatus Liberibacter americanus* (Lam) ;
- *Candidatus Liberibacter africanus* (Laf).

Seules deux espèces sont tolérantes à la chaleur : Las et Lam qui présentent une tolérance aux hautes températures ; et un contexte épidémiologique particulièrement actif pour Las, notamment dans les régions d'Amérique du Nord (Gottwald 2010). Les deux autres espèces sont en fort déclin. Las est d'origine asiatique et a été caractérisé en 1970 dans ces régions. Lam est apparu dans les années 2004-2005 en Amérique Latine (Teixeira, et al. 2005), mais n'est pas une mutation spontanée

de Las, car trop de différences génétiques sont observées ; tout comme Laf, apparu en 1990 en Afrique.

Contexte épidémiologique

La maladie est propagée par deux psylles avec une vection rapide et sur de longues distances : *Diaphorina citri* (Las et Lam) et *Trioza erytreae* (Laf). L'efficacité de la vection dépend du couple psylle/Ca. *L. spp.*, mais globalement les deux espèces de psylles sont vectrices de toutes les espèces de *Candidatus Liberibacter*.

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 cellules cibles est plus forte dans les deux premiers tiers du pétiole et est dépendante de la variété d'agrumes (Li, et al. 2009; Tatineni, et al. 2008).

2. Objet

La présente méthode vise à détecter *Candidatus Liberibacter asiaticus, africanus et americanus* dans des nervures de feuilles de *Rutaceae* par biologie moléculaire. Elle repose sur une extraction d'ADN à partir des nervures de feuilles et une amplification simultanée de deux fragments du génome de Ca. *L. spp.* provoquant le Huanglongbing.

Cette méthode est qualitative, c'est à dire qu'elle donne un résultat du type « positif » ou « négatif ». Un résultat positif indique la présence ou la suspicion de 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.

La présente méthode indique également la conduite à tenir en cas de résultats difficiles à interpréter (faible signal ; voir résultats).

3. Domaine d'application

Objets susceptibles d'être soumis à analyse

La méthode s'applique aux échantillons de feuilles de plantes de la famille des *Rutaceae*, sur plantes symptomatiques ou asymptomatiques.

Limitations relatives aux objets susceptibles d'être soumis à analyse

Les échantillons doivent arriver au laboratoire en bon état, non altérés par une décomposition des tissus ou autre. Les échantillons peuvent être sous état frais ou lyophilisé, en feuilles entières ou en nervures excisées.

Dans le cas contraire, le laboratoire émet des réserves sur tout résultat d'analyse négatif en précisant les causes de non-conformité 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.

Grandeur de l'objet soumis à analyse

Le laboratoire réalise l'analyse sur une masse de nervures excisées de 1 g de matériel végétal frais ou 0,35 g de matériel végétal lyophilisé ou déshydraté selon un processus équivalent. Pour chaque échantillon, l'analyse est réalisée sur une prise d'essai composée de matériel végétal prélevé sur l'ensemble des nervures 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.

En deçà d'une quantité (masse) analysable, des réserves sont émises quant au résultat d'analyse si ce dernier est négatif.

Précaution(s) particulière(s) à prendre

Le délai entre la réception de l'échantillon et le début de l'analyse doit être de préférence inférieur à 7 jours et ne doit pas dépasser 14 jours pour les échantillons frais prélevés dans de bonnes conditions ; dans le cas d'un échantillon lyophilisé, ce délai peut être allongé à 1 mois. L'échantillon devra pendant ce temps être conservé à +5°C.

4. Présentation schématique de la détection

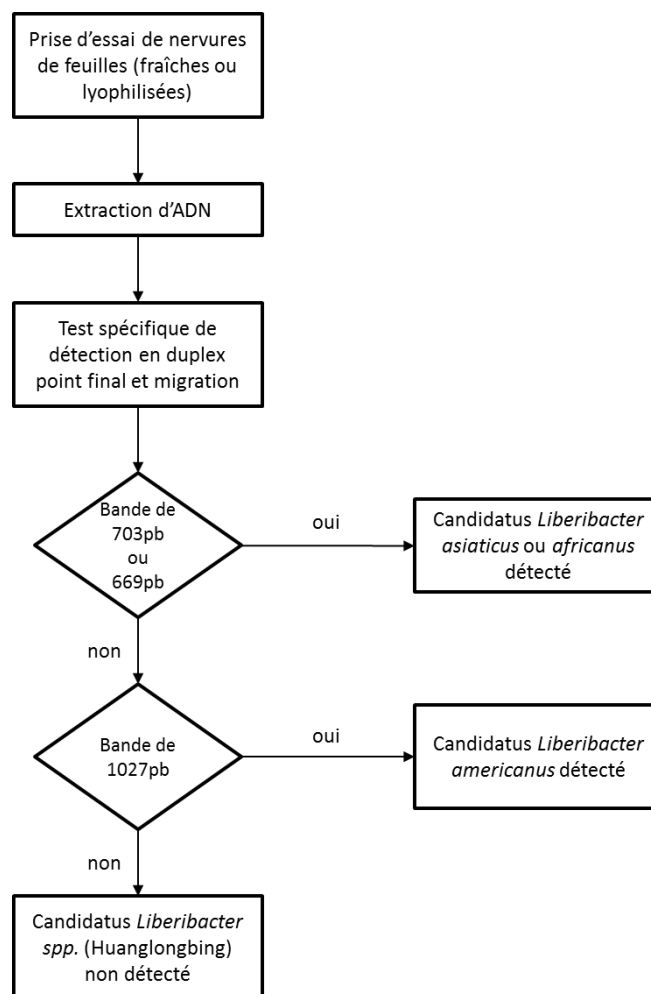


Figure 1 - Schéma de détection de *Candidatus Liberibacter* spp. provoquant la maladie du Huanglongbing sur plantes hôtes de la famille des *Rutaceae*.

Les laboratoires mettant en œuvre la détection des souches pathogènes ou latentes des agrumes provoquant la maladie du Huanglongbing doivent réaliser un test de détection basé sur un principe de biologie moléculaire : PCR multiplex à partir de l'extraction d'ADN des nervures de feuilles.

Les résultats possibles sont les suivants :

- Une bande d'amplification PCR obtenue à 703 pb ou 669 pb implique la détection de *Candidatus Liberibacter asiaticus* ou *Candidatus Liberibacter africanus*.
- Une bande d'amplification PCR obtenue à 1027 pb implique la détection de *Candidatus Liberibacter americanus*.
- L'absence de bande ou la présence de bande d'amplification PCR à une autre taille que 669 pb, 703 pb ou 1027pb implique l'absence de détection de *Candidatus Liberibacter* spp. responsable de la maladie du Huanglongbing sur plante hôte de la famille des *Rutaceae*.

5. Produits et consommables

En règle générale, l'opérateur 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 contaminations 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. À défaut le laboratoire définira les conditions qu'il jugera les plus optimales.

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

Pour la composition des milieux, solutions et tests biochimiques, se reporter à la méthode officielle d'analyse MOA REP 001 répertoire des recettes.

5.1. Milieux et solutions

5.1.1. Réactifs de biologie moléculaire

Certains réactifs sont critiques et conditionnent la performance des étapes d'extraction et d'amplification (eau de qualité biologie moléculaire, kit d'extraction d'ADN, mastermix ou kit commercial de polymérase thermostable, dNTP, amorces).

Ces réactifs doivent être utilisés et pour certains contrôlés conformément à la méthode officielle d'analyse MOA 022. Pour le choix des fournisseurs, un conseil peut être apporté par le laboratoire de référence et il est recommandé de contacter celui-ci en cas de doute sur le réactif adéquat.

Conservation :

Les réactifs sont à conserver selon les recommandations des fournisseurs.

5.1.2. Tampons

Composition et préparation :

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

- Tampon de broyage (TRIS/EDTA/SDS) ;
- Tampons d'extraction d'ADN (validés avec ceux du **DNeasy® Plant Mini Kit, Qiagen**) ;
- Tampon de migration pour l'électrophorèse (par exemple : TAE ou TBE) ;
- Tampon de charge (si celui-ci n'est pas intégré au tampon du master mix ; MOA REP 001).

Les tampons utilisés en kit commercial doivent être ceux préconisés par le fournisseur de réactifs. Le laboratoire peut aussi fabriquer certains tampons. Pour cela, le laboratoire se référera au répertoire des recettes en vigueur au Laboratoire de la santé des végétaux (MOA REP-001).

Conservation : Les préparations des tampons ainsi que leurs durées et conditions de conservation doivent être conformes aux recommandations du fournisseur ou au répertoire des recettes le cas échéant.

5.2. Oligonucléotides

Séquences des primers spécifiques des *Candidatus Liberibacter asiaticus* et *africanus* (Hocquellet, et al. 1999).

- **A2** : 5' TAT AAA GGT TGA CCT TTC GAG TTT 3'
- **J5** : 5' ACA AAA GCA GAA ATA GCA CGA ACA A 3'

Gène amplifié : opéron *rplKAJL* – *rpoBC*.

Taille des bandes attendues :

- 703 pb pour Las
- 669 pb pour Laf

Séquences des primers spécifiques de *Candidatus Liberibacter americanus* (Teixeira, et al. 2005).

- **GB1** : 5' AAG TCG AGC GAG TAC GCA AGT ACT 3'
- **GB3** : 5' CCA ACT TAA TGA TGG CAA ATA TAG 3'

Gène amplifié : 16S ARN ribosomal.

Taille de la bande attendue : 1027 pb pour Lam.

Les différents couples de primers sont commandés avec *a minima* une méthode de purification standard : dessalés.

5.3. Autres consommables

- **Eau de qualité « analytique »** (*i.e.* déminéralisée, distillée, osmosée, HPLC...) stérilisée garantissant d'atteindre les critères de performance attendus pour les tests ;
- **Détergent** (et éventuellement un produit détergent désinfectant de type Aniospray) : désinfection des surfaces de travail et du matériel ;
- **Glace pilée** ;
- **Tubes** pour dilutions ;
- **Cônes stériles** avec et sans filtre de volume adaptés ;

- **Produits de décontamination de type DNA Away** : désinfection des surfaces de travail et du matériel à partir de l'étape d'extraction ;
- **Taq** polymérase et Mastermix (et tampons nécessaires dans le mastermix pour l'amplification moléculaire. Le protocole a été évalué avec le mélange réactionnel du kit Gotaq® Hot Start Polymerase de Promega. Ce réactif n'étant plus produit, le mélange réactionnel du kit Gotaq® G2 Hot Start Polymerase de Promega a été validé et peut être utilisé en remplacement) ;
- **Bromure d'éthidium** ou autre agent intercalant équivalent ;
- **Sachets de broyage avec filtre.**

6. Appareillage et matériel

Pour la mise en œuvre de cette méthode, le laboratoire disposera d'appareils courants de laboratoire de bactériologie et notamment :

- Bain sec ou humide thermostaté ;
- Agitateur ;
- Enceinte réfrigérée à +5°C ;
- Congélateur ;
- Système de production d'eau déminéralisée ;
- Autoclave ;
- Balances ayant une précision au gramme, au dixième et millième de gramme ;
- Micropipettes dispensant des volumes adaptés ;
- Broyeur à billes ou équivalent ;

Pour la partie PCR, se référer à la MOA022 ;

- Un thermocycleur (méthode validée sur Veriti®, Applied Biosystems) ;
- Cuve électrophorèse ;
- Système d'acquisition d'images.

7. Contrôles et témoins

Des matériaux de référence doivent être inclus en cours de processus analytique pour valider les différentes étapes de la méthode. Leur observation et/ou lecture et conformité à l'attendu sont un préalable à l'interprétation des résultats obtenus sur les échantillons soumis à analyse. Les témoins sont de trois natures différentes :

- **Témoin négatif de processus (E-)** : matrice ne contenant pas l'organisme cible, traitée dans les mêmes conditions que les échantillons à analyser, déclarée non contaminée à l'issue de la manipulation (nervures de feuilles non infectées).
- **Témoin positif de processus (E+)** : matrice contenant l'organisme cible : *Candidatus Liberibacter* spp. provoquant le Huanglongbing, traitée dans les mêmes conditions que les échantillons à analyser, déclarée contaminée à l'issue de la manipulation (nervures de feuilles infectées). Il donne au minimum l'assurance d'un déroulement correct de la manipulation. Pour chaque série d'analyses, on utilisera un échantillon de référence naturellement contaminé.
- **Témoin négatif de PCR (A- ou Teau)** : 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.

- **Témoin positif de PCR (A+)** : ADN de *Ca. L. asiaticus* ou *africanus* permettant de vérifier le bon fonctionnement de l'amplification moléculaire. Dans le cadre d'une gestion de foyer épidémique lié à l'espèce *americanus* (ou forte suspicion), un témoin ADN de *Ca. L. americanus* est obligatoire afin de vérifier le bon fonctionnement de l'amplification moléculaire par le couple GB1/GB3. Cependant un seul témoin positif de PCR est nécessaire pour la validation de l'amplification moléculaire.

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 contrôles peuvent être ajoutés si nécessaire et sont définis par la norme XP V03-043. L'utilisation de ces références sert à valider le bon déroulement des différentes étapes de l'analyse ainsi que les résultats obtenus sur les différentes plaques. Leur observation et/ou lecture et conformité à l'attendu sont un préalable à l'interprétation des résultats obtenus sur les échantillons soumis à analyse.

8. Étapes de l'analyse

8.1. Prise d'analyse

Le traitement des échantillons doit se faire dans les meilleurs délais afin de minimiser les pertes dues à la dégradation naturelle des nervures de feuilles. Veiller à désinfecter le matériel de manipulation utilisé pour les prélèvements entre chaque échantillon.

Un échantillon réceptionné pour analyse est constitué de 15 feuilles ou nervures 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'essais d'au moins 1 g pour les échantillons frais ou 0,35 g 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 pour les échantillons frais ou proche de 0,35 g 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 sont découpées en tronçons et homogénéisées afin que l'étape de prise d'essai se réalise sur la totalité des nervures prélevées ;
2. Pour des échantillons réceptionnés frais : prélever 1 g de nervures ; pour des échantillons réceptionnés lyophilisés : prélever 0,35 g de nervures ;
3. Les prises d'essai sont placées dans des sachets de broyage adaptés au type de broyeur (ex HOMEX 6). Ajouter 5 mL de tampon de broyage TRIS/EDTA/SDS (annexe 1). Pour permettre la réhydratation des nervures lyophilisées laisser reposer les sachets pendant 10 minutes avant de procéder à l'étape de broyage et de concentration.

Les éventuels reliquats d'échantillons pertinents (portions de nervures surnuméraires) doivent être conservés à +5°C dans l'hypothèse de la nécessité d'une analyse de confirmation.

8.2. Broyage et concentration

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 après broyage est nécessaire pour un rendement optimal de souches cibles. A l'issue de cette étape, transférer 2 mL (au moins 1,5 mL) de broyat dans un tube Eppendorf de 2 mL afin de réaliser les étapes ultérieures.

A l'issue du broyage et de la phase de libération, les échantillons sont centrifugés à 20 000 g pendant 10 min, afin de précipiter toutes les cellules cibles. Jeter le surnageant et poursuivre les étapes ultérieures d'extraction d'ADN.

Remarque : dans le cas d'un traitement différé de l'échantillon centrifugé, il est fortement recommandé de le conserver à une température de $\leq -18^{\circ}\text{C}$ une fois le surnageant jeté.

8.3. Extraction d'ADN

L'extraction d'ADN est réalisée par 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 aux dispositions du point « modifications des méthodes officielles » en préambule.

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. Étape optionnelle de concentration de l'ADN extrait

Dans le cadre d'une augmentation de la capacité de détection, une étape optionnelle peut être réalisée en concentrant les ADN un concentrateur de type Speedvac. Les étapes sont les suivantes :

- Déshydrater complètement l'extrait d'ADN dans un concentrateur de type Speedvac ;
- Remettre en solution l'extrait dans un volume d'eau de qualité biologie moléculaire dix fois inférieur à celui d'origine (par exemple, pour 200 μL d'ADN extrait à suspendre dans 20 μL).

Ainsi, un gain d'un coefficient 10 est observé sur la concentration de l'ADN.

8.5. Amplification des séquences cibles par PCR

8.5.1. Préparation du mélange réactionnel

Tableau 1 - Mix réactionnel pour la PCR de détection des souches responsables de la maladie du Huanglongbing sur plantes hôtes de la famille des *Rutaceae*

Réactifs	[Cf]	[Ci]	[Puits]
Eau			10,38
Buffer	1 x	5 x	5
MgCl ₂	2 mM	25 mM	2
dNTPs	0,2 mM	10 mM	0,5
Primer GB1	1 μM	20 μM	1,25
Primer GB3	1 μM	20 μM	1,25
Primer A2	1 μM	20 μM	1,25
Primer J5	1 μM	20 μM	1,25
GoTaq	0,625 U	5 U/μL	0,125
ADN			2
Total			25

[Ci] : Concentration des solutions mères ; *[Cf]* : concentration finale dans le mix réactionnel ; *[Puits]* : volume final en μL dans chaque puits PCR réactionnel.

Remarque :

- Le volume final est de 25 μL dans chaque puits soit 23 μL de mélange réactionnel et 2 μL d'extrait d'ADN ou d'eau (dans le cadre du témoin négatif de PCR) ;
- Le protocole a été évalué avec le mélange réactionnel du kit Gotaq® Hot Start Polymerase de Promega. Ce réactif n'étant plus produit, le mélange réactionnel du kit Gotaq® G2 Hot Start Polymerase de Promega a été validé et peut être utilisé en remplacement ; s'agissant d'un réactif critique, l'utilisation d'un autre mélange réactionnel est assujettie aux dispositions du point « modifications des méthodes officielles » en préambule. Dans ce kit, le tampon est disponible soit avec le tampon de charge déjà mélangé, soit sans le tampon de charge. La validation a été réalisée avec le tampon contenant le tampon de charge ;
- Établir soigneusement le plan de distribution (plan de plaque) des extraits. Chaque échantillon est déposé deux fois soit 2 puits par échantillon (analyse de détection).

8.5.2. Dépôt des ADN

Déposer deux puits PCR par prise d'essai pour les échantillons et un ou deux puits selon les différents témoins (voir partie 7).

8.5.3. Cycles thermiques PCR

Tableau 2 - Cycle PCR pour la détection des souches responsables de la maladie du Huanglongbing sur plantes hôtes de la famille des *Rutaceae*

	Température (°C)	Durée	Cycles
Dénaturation initiale	96	5 min	
Dénaturation	94	30 s	35
Hybridation	62	30 s	
Élongation	72	60 s	
Élongation finale	72	10 min	
Conservation	4	∞	

8.6.Électrophorèse et révélation

Déposer 10 µL de l'amplifiat, soit directement soit mélangé à du tampon de charge (environ 1 µL pour 10 µL d'amplifiat) selon le type de tampon utilisé précédemment (cf. remarque §8.5.1), sur un gel d'agarose à 2% (masse/volume).

Un marqueur de taille moléculaire, dont l'intervalle encadre la taille des fragments attendus, doit être déposé sur chaque ligne de dépôt afin de définir la taille des fragments obtenus.

Effectuer l'électrophorèse dans du tampon de migration à une concentration identique à celle utilisée pour réaliser le gel (à titre indicatif la migration peut se faire avec les paramètres suivants : 90 volts durant 45 min).

La coloration du gel se fait dans un bain de bromure d'éthidium (BET) et la révélation sous UV. Il est conseillé d'effectuer une prise de vue du gel et d'utiliser une impression papier ou le fichier informatique pour analyser les résultats.

D'autres marqueurs d'ADN équivalents peuvent également être utilisés.

Remarque : Veiller à la protection des utilisateurs contre les UV (yeux, peau). Veiller également à la protection des utilisateurs lors de la manipulation du BET ou tout autre marqueur d'ADN par le port de gants nitriles. Tous les déchets ayant été en contact avec ces marqueurs d'ADN doivent être éliminés selon une procédure adaptée à ces déchets toxiques.

8.7. Résultats

L'analyse est validée si les conditions du tableau 3 sont vérifiées : (voir MOA 022)

Tableau 3 - Matrice de décision pour l'interprétation des résultats des contrôles PCR

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(s) positif(s) de PCR (A+)	+	+*	POSITIF

*La duplication de ce témoin est facultative

8.7.1. Analyse et interprétation des résultats

Dans le cas d'une analyse de résultat PCR :

- Le résultat d'un puits PCR est positif pour la détection de *Candidatus Liberibacter africanus* ou *asiaticus*, s'il présente une bande d'amplification PCR à la taille attendue de 669 pb ou 703 pb respectivement ;
- Le résultat d'un puits PCR est positif pour la détection de *Candidatus Liberibacter americanus*, s'il présente une bande d'amplification PCR à la taille attendue de 1027 pb ;
- Le résultat d'un puits PCR est négatif s'il ne présente aucune bande ou une bande d'une autre taille que celles attendues à 669 pb, 703 pb ou 1027 pb.

Les résultats d'analyse s'interprètent de la manière suivante :

Tableau 4 - Matrice de décision pour l'interprétation des résultats d'analyse

Prise d'essai		Résultat
Puits 1	Puits 2	
+	+	POSITIF
+	-	PCR à refaire Si à nouveau au moins 1 positif sur 2, le test est interprété comme positif
-	-	NÉGATIF

8.7.2. Formulation des résultats

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

Tableau 5 - Formulation des résultats d'amplification PCR

Test PCR sur ADN extrait			
Résultat	POSITIF	POSITIF	NÉGATIF
Taille de bande d'amplification PCR	669 pb ou 703 pb	1027 pb	Néant ou bandes d'amplification différentes
Interprétation	<i>Candidatus Liberibacter africanus</i> ou <i>asiaticus</i> <u>déTECTÉ</u> dans l'échantillon xx par méthode PCR conventionnelle	<i>Candidatus Liberibacter americanus</i> <u>déTECTÉ</u> dans l'échantillon xx par méthode PCR conventionnelle	<i>Candidatus Liberibacter</i> spp. provoquant le Huanglongbing <u>non déTECTÉ</u> dans l'échantillon xx par méthode PCR conventionnelle

9. Analyses de confirmation

Une analyse de confirmation doit être réalisée au cas par cas pour les échantillons pour lesquels le résultat est indéterminé comme par exemple dans le cas d'une amplification insuffisante (par exemple bande d'intensité très faible) ou non répétable (se référer au tableau 4), pour permettre de statuer clairement sur le caractère positif ou négatif de l'échantillon.

Remarque : dans le cas d'une bande de taille 669 pb ou 703 pb d'intensité trop faible, une PCR simplex peut être envisagée à l'aide du couple d'amorces PCR A2/J5 (remplacer le volume des amorces GB1/GB3 par de l'eau de qualité biologie moléculaire dans le mastermix PCR) ; le gain de rendement permet souvent de lever l'incertitude. De la même manière, si l'on observe une bande de taille 1027 pb d'intensité trop faible, une PCR simplex peut être envisagée à l'aide du couple d'amorces PCR GB1/GB3 (remplacer le volume des amorces A2/J5 par de l'eau de qualité biologie moléculaire dans le mastermix PCR).

Cette confirmation se fait à partir de l'extrait d'ADN ou, à défaut, des reliquats d'échantillons primaires (nervures de feuilles) ou si l'état de conservation de ces échantillons le permet ; sinon elle se fait à partir de nouveaux prélèvements.

Les reliquats d'analyse pertinents (nervures surnuméraires conservées à +5°C et extraits d'ADN conservés à une température ≤ -18°C) doivent également être fournis au laboratoire réalisant l'analyse de confirmation.

10. Élimination des matériels susceptibles d'être contaminants

Les cellules de *Candidatus Liberibacter* spp. provoquant le Huanglongbing sur plantes hôtes de la familles des *Rutaceae* sont adaptées à une survie dans un hôte, que ce soit la plante ou l'insecte vecteur. Les structures cellulaires hôtes sont indispensables à leur survie. Il est donc suffisant de détruire ou de déstructurer les tissus végétaux constituant l'échantillon pour éviter leur maintien et éventuellement leur dissémination.

Les insectes vecteurs peuvent aussi constituer une source de dissémination.

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.

Ainsi, tout fragment de matériel végétal infecté (ou de statut indéterminé) doit être détruit par autoclavage ou autre moyen inactivant cette bactérie.

Les consommables ayant été en contact avec le matériel végétal infecté (ou de statut indéterminé) doivent être autoclavés (sachet de broyage, tube, plaque de microtitration et PCR...).

Le matériel ayant été en contact avec le végétal infecté (ou de statut indéterminé) doit être désinfecté.

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.

REMERCIEMENTS

L'unité RAPT remercie l'unité « Développement de Méthodes et Analyses » du Laboratoire de la Santé des Végétaux pour la relecture critique de la méthode ainsi que le laboratoire de l'INRA de Bordeaux (UMR 1090) pour les échanges techniques sur la méthode d'origine.

LISTE DES DOCUMENTS OFFICIELS APPELES PAR LA METHODE

Référence	Titre
REP 001	Répertoire des recettes en vigueur au Laboratoire de la santé des végétaux
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
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
GLO 001	Glossaire des termes techniques en vigueur au Laboratoire de la santé des végétaux
ISO 17025	Exigences générales concernant la compétence des laboratoires d'étalonnages et d'essais
Directive 2000/29/CE	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
Arrêté préfectoral N°2011- 001479	Fixant les conditions phytosanitaires requises pour l'introduction sur le territoire de l'île de la Réunion de végétaux, produits végétaux et autres objets
Arrêté du 31 juillet 2000 modifié par l'arrêté du 25 aout 2011	Établissant la liste des organismes nuisibles aux végétaux soumis à des mesures de lutte obligatoire

ANNEXE 1 - COMPOSITION DU TAMPON DE BROYAGE TRIS/EDTA/SDS

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

Composants	Masse Molaire (g/mol)	Concentration finale	Masse (g)
Tris-HCL - pH 8,0	121,135	50 mM	6,06
Acide Éthylène Diamine Tétraacétique (EDTA)	292,243	5 mM	1,46
Dodécylsulfate de sodium (SDS)	288,379	1%	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.

Consignes d'utilisation :

N'utilisez le tampon de broyage qu'à température ambiante et le conserver à +5°C pour une durée maximale de 1 mois.

Remarque 1 : la dissolution de certains éléments dans de l'eau peut s'avérer difficile dans les conditions normale 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 de +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 45min à 25°C pour 500 mL).

BIBLIOGRAPHIE SUCCINCTE

1. **Bové, J. M.** 2006. Huanglongbing: a destructive, newly-emerging, century-old, disease of citrus. *Journal of Plant Pathology* **88**:7-37.
2. **Gottwald, T. R.** 2010. Current epidemiological understanding of citrus Huanglongbing. *Annual Review of Phytopathology* **48**:119-139.
3. **Hocquellet, A., P. Toorawa, J. M. Bove, and M. Garnier.** 1999. Detection and identification of the two *Candidatus Liberobacter* species associated with citrus huanglongbing by PCR amplification of ribosomal protein genes of the beta operon. *Molecular Cellular Probes* **13**:373-379.
4. **Li, W., L. Levy, and J. S. Hartung.** 2009. Quantitative distribution of '*Candidatus Liberibacter asiaticus*' in citrus plants with citrus huanglongbing. *Phytopathology* **99**:139-144.
5. **Tatineni, S., U. S. Sagaram, S. Gowda, C. J. Robertson, W. O. Dawson, T. Iwanami, and N. Wang.** 2008. *In planta* distribution of '*Candidatus Liberibacter asiaticus*' as revealed by polymerase chain reaction (PCR) and real-time PCR. *Phytopathology* **98**:592-599.
6. **Teixeira, D. C., J. L. Danet, S. Eveillard, E. C. Martins, W. Cintra de Jesus, P. T. Yamamoto, S. A. Lopes, R. B. Bassanezi, A. J. Ayres, C. Saillard, and J. M. Bové.** 2005. Citrus huanglongbing in São Paulo State, Brazil: PCR detection of the '*Candidatus Liberibacter* species associated with the disease. *Molecular and Cellular Probes* **19**:173-179.

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 :

ANSES

Laboratoire de la santé des végétaux

Station de la Réunion

Unité Ravageurs et Agents Pathogènes Tropicaux

Pôle de protection des plantes

7, chemin de l'Irat

97410 SAINT PIERRE

lsv@anses.fr

Ce document est édité par :

Ministère de l'alimentation, de l'agriculture et de la pêche

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.