

## Méthode d'analyse en santé des végétaux

RÉFÉRENCE : ANSES/LSV/MA035 - Version 2

Mars 2018

# Détection de *Pseudocercospora fijiensis* par PCR en temps réel duplex



Credit photo. C. Abadie, CIRAD

**Laboratoire de la Santé des Végétaux**

**Laboratoire national de référence « Champignons sur toute matrice »**



## 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		Mai 2014	Version initiale
v2	majeures	Mars 2018	<ul style="list-style-type: none"><li>• Changement de type de broyage et de matériel de broyage</li><li>• Mise à jour de la dénomination scientifique de l'organisme cible (<i>Pseudocercospora fijiensis</i>) selon les nouvelles règles de nomenclature en mycologie</li><li>• Mise à jour des règles de décision et de leur présentation</li><li>• Changement de format de présentation de la méthode</li></ul>

\* La version 2 a fait l'objet d'une consultation du 29/12/2017 au 09/02/2018 sur le site internet de l'agence.



## Avant-propos

La présente méthode a été développée par :

**Anses - Laboratoire de la Santé des Végétaux, Unité de Mycologie**

Laboratoire National de Référence Champignons sur toute matrice

Adresse : Domaine de Pixérécourt, Bâtiment E, CS40009, 54220 Malzéville

Contact : nancy.lsv@anses.fr

La présente version de la méthode a été rédigée en se basant sur la publication « Molecular Diagnostics for the Sigatoka Disease Complex of Banana » Arzanlou et al. 2007.

La présente méthode a été optimisée, caractérisée et validée par l'Unité de Mycologie du Laboratoire de la Santé des Végétaux.

Ce travail a bénéficié de la collaboration de M.F. Zapater (CIRAD Montpellier) et de C. Abadie (CIRAD Guadeloupe).

La méthode a été révisée par l'unité de mycologie du Laboratoire de la Santé des Végétaux.

Le travail de relecture a été effectué par l'Unité de « Coordination de la Référence » du Laboratoire de la Santé des Végétaux.



## Sommaire

<b>Avant-propos</b> .....	<b>3</b>
<b>Introduction</b> .....	<b>5</b>
<b>Avertissements et précautions de sécurité</b> .....	<b>6</b>
<b>1. Objet et domaine d'application</b> .....	<b>7</b>
<b>2. Documents de référence</b> .....	<b>7</b>
<b>3. Termes, sigles et définitions</b> .....	<b>7</b>
<b>4. Principe de la méthode</b> .....	<b>8</b>
<b>5. Réactifs</b> .....	<b>9</b>
5.1 Eau.....	9
5.2 Kits d'extraction d'ADN .....	9
5.3 Polyvinylpolypyrrolidone .....	9
5.4 Oligonucléotides .....	9
5.5 Kit d'amplification pour PCR en temps réel.....	9
5.6 Autres consommables à usage unique .....	10
5.7 Contrôles et témoins.....	10
<b>6. Appareillage et matériels</b> .....	<b>12</b>
<b>7. Échantillons</b> .....	<b>13</b>
7.1 Conditions d'acceptation des échantillons .....	13
7.2 Conservation des échantillons avant analyse .....	13
7.3 Conservation des échantillons ou reliquats après analyse.....	13
<b>8. Mode opératoire</b> .....	<b>14</b>
8.1 Préparation des échantillons pour analyse .....	14
8.2 Broyage des prises d'essai et extraction de l'ADN total .....	14
8.3 Test de détection par PCR en temps réel duplex.....	15
<b>9. Résultats</b> .....	<b>16</b>
9.1 Contrôle de la validité des résultats .....	16
9.2 Calculs et expression des résultats .....	17
<b>10. Caractéristiques de performance de la méthode</b> .....	<b>18</b>
<b>Annexe 1 : Symptômes de <i>Pseudocercospora fijiensis</i></b> .....	<b>21</b>
<b>Annexe 2 : Tables décisionnelles</b> .....	<b>22</b>
<b>Bibliographie</b> .....	<b>23</b>



## Introduction

Le champignon *Pseudocercospora fijiensis* (Morelet) Deighton (anciennement *Mycosphaerella fijiensis* Morelet), agent de la cercosporiose noire du bananier (maladie des raies noires) ou black Sigatoka disease, est un ascomycète appartenant à la famille des *Mycosphaerellaceae*.

Ce pathogène est inféodé à la plupart des groupes génomiques de bananiers cultivés ou sauvages. Ce sont soit des bananiers cultivés à des fins de productions industrielles (ex. : Cavendish) soit d'autres espèces destinées à des productions d'autoconsommation (ex. : plantain).

*P. fijiensis* cause des dégâts importants au système foliaire du bananier. Les premiers symptômes apparaissent sur la face inférieure du limbe sous la forme de petits tirets jaunes puis marron foncé de 1 à 2 mm de long qui s'élargissent pour former des lésions nécrotiques à halo jaune et centre gris clair. Ces lésions lorsqu'elles deviennent coalescentes, détruisent de vastes portions de tissus foliaires, entraînant une réduction du rendement et une maturation prématurée des fruits.

L'arrêté du 31 juillet 2000, version consolidée au 24 février 2017, établissant la liste des organismes nuisibles aux végétaux, prévoit pour la Guadeloupe, la Martinique, la Réunion et la Guyane, l'inscription de *Mycosphaerella fijiensis* (ancienne taxonomie) en annexe A (liste des organismes pour lesquels la lutte est obligatoire, de façon permanente sur tout le territoire).



## **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.**

L'exigence de confinement pour la manipulation de formes viables de cet agent pathogène à dissémination aérienne doit être de type NS3.

### **Élimination des matériels susceptibles d'être contaminants :**

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

Les tubes et autres consommables plastiques ayant été utilisés pendant la phase d'extraction - purification d'ADN total peuvent être éliminés sans traitement particulier (plus de parasite viable à ce stade).

Les tubes et autres consommables plastiques ayant été utilisés lors de la phase de préparation du mélange réactionnel et chargement des solutions d'ADN (SADN) peuvent être éliminés sans traitement particulier.



## 1. Objet et domaine d'application

L'objet de cette méthode est de détecter la présence de *P. fijiensis* dans un échantillon prélevé sur plante hôte. La présence de *P. fijiensis* est mise en évidence par un test de détection par PCR (Polymerase Chain Reaction) en temps réel utilisant une combinaison d'amorces et de sonde d'hydrolyse ciblant une région spécifique dans le gène  $\beta$ -tubuline.

Cette méthode est qualitative et permet de détecter *P. fijiensis* dans la limite du seuil de détection de la technique employée sans objectif de quantification.

Les échantillons pour lesquels une réponse négative est obtenue sont considérés comme indemnes de *P. fijiensis* ou contaminés à un niveau trop faible pour être mis en évidence par la technique utilisée.

### Objets susceptibles d'être soumis à analyse

Cette méthode permet de détecter *Pseudocercospora fijiensis* sur les feuilles de *Musa* spp.

### Limitations relatives aux objets susceptibles d'être soumis à analyse

Cette méthode s'applique sur feuilles présentant des symptômes à tous les stades de lésions (stade 1 à 6  $\Rightarrow$  cf. Annexe 1), soit sous la forme de tissus frais ou préalablement lyophilisés, soit sur des extraits d'ADN.

### Grandeur de l'objet soumis à analyse

Afin de faciliter les manipulations au laboratoire, les échantillons prélevés sur plante hôte sont constitués de découpes de tissus foliaires symptomatiques dont la taille maximale individuelle est de préférence inférieure à 25 x 20 cm.

## 2. Documents de référence

- [1] MOA022 : Techniques qualitatives d'amplification enzymatique des acides nucléiques : PCR (Polymerase Chain Reaction), RT-PCR (Reverse Transcription-PCR) et PCR temps réel. Détection des organismes phytopathogènes

## 3. Termes, sigles et définitions

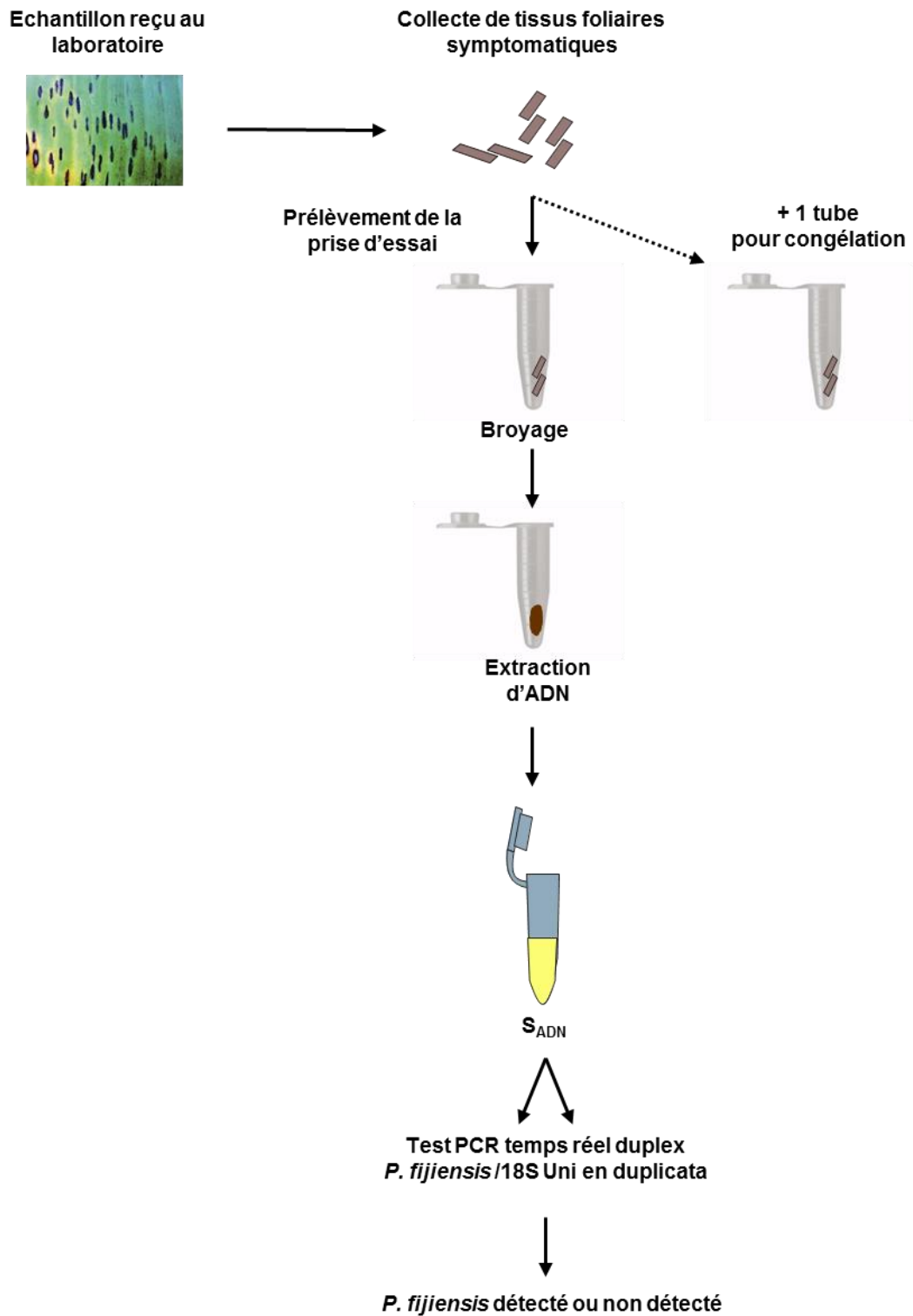
Afin de limiter les problèmes d'interprétation des termes employés, le vocabulaire utilisé dans la présente méthode d'analyse est issu des normes, guides ou glossaires nationaux ou internationaux appropriés (AFNOR, ISO, CIPV, OEPP...).

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 de la méthode d'analyse.



## 4. Principe de la méthode

Le principe de la méthode est présenté dans le schéma ci-dessous :







## 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.

### 5.1 Eau

L'eau ultra pure (EUP) doit présenter une qualité suffisante pour une utilisation en biologie moléculaire.

### 5.2 Kits d'extraction d'ADN

L'ADN total des échantillons analysés (à la fois ADN végétal, ADN fongique, et éventuellement bactérien, viral etc.) est extrait et purifié à l'aide d'un mini kit d'extraction d'ADN de plante disponible dans le commerce. La présente méthode a été caractérisée et validée avec le DNeasy® Plant Mini Kit (Qiagen) (Arzanlou et al. (2007)), en utilisant le tampon de lyse AP1 fourni par le fabricant (dossier LNR de validation de la méthode MOA035).

### 5.3 Polyvinylpolypyrrolidone

Cette méthode a été validée avec l'utilisation du Polyvinylpolypyrrolidone (**PVPP**) en poudre (Sigma-Aldrich) (dossier LNR de validation de la méthode MOA035).

### 5.4 Oligonucléotides

Cible	Amorce ou sonde	Sequence (5'-3')
<i>P. fijiensis</i>	MFB F <sup>a</sup>	CGACACAGCAAGAGCAGCTTC
	MFB Rtaq <sup>a</sup>	TTCGAAAGCCTTGGCACTTCAA
	MFB P <sup>a</sup>	[6-FAM]- CTGAGCACGACTGACCACAACGCA -[BHQ1]
Plante/champignon	18S uni-F <sup>b</sup>	GCAAGGCTGAAACTTAAAGGAA
	18S uni-R <sup>b</sup>	CCACCACCCATAGAATCAAGA
	18S uni-P <sup>b</sup>	[JOE]- ACGGAAGGGCACCACCAGGAGT-[BHQ1]

<sup>a</sup> Arzanlou et al. 2007)

<sup>b</sup> loos et al. 2009)

Les fluorophores rapporteurs utilisés pour chaque sonde peuvent être modifiés sous réserve que le fluorophore extincteur associé soit adapté.

### 5.5 Kit d'amplification pour PCR en temps réel

Le Kit utilisé lors de la caractérisation et validé pour cette méthode est le qPCR Mastermix No Rox (Eurogentec) (dossier LNR de validation de la méthode MOA035).



## 5.6 Autres consommables à usage unique

- Microcônes stériles à filtre de volumes adaptés
- Microtubes stériles de 2 mL
- Microtubes ou capillaires stériles pour PCR en temps réel de volume adapté au thermocycleur temps réel utilisé, à paroi fine, individuels, en barrette de 4, 8 puits ou en plaque de 96 puits.
- Microtubes de lysing matrix A de 2mL (MP Biomedicals).

## 5.7 Contrôles et témoins

La technique de détection de régions cibles d'ADN d'un organisme par la technique de PCR en temps réel impose 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 par micropipettes, les températures et durées de réaction, la concentration et le pH des solutions utilisées étaient corrects,
- l'extrait d'ADN était suffisant en quantité et amplifiable (pas d'interférence avec des composés inhibiteurs),
- qu'il n'y a pas eu de contamination accidentelle des échantillons testés.

Les contrôles à produire au cours de l'analyse sont à *minima* les suivants :

- **Un contrôle de la qualité de l'extraction d'ADN et de la présence d'inhibiteur sera réalisé pour chaque prise d'essai.** Il prendra la forme d'un test PCR temps réel utilisant la combinaison d'amorces / sonde 18S uni -F/-R/-P. Ce test permet de générer un signal de fluorescence de nature exponentielle significativement supérieur au bruit de fond si de l'ADN de plante ou de champignon est présent dans un extrait, sans effet inhibiteur suffisant (loos et al., 2009). Cet outil peut être utilisé en multiplexage (loos et al., 2010) et ce contrôle de la qualité d'extraction et de la présence d'inhibiteur sera réalisé dans la même réaction que le test de détection de *P. fijiensis* (duplex). L'analyse des courbes de fluorescence 18S uni-F/-R/-P se limitera aux données acquises lors des 30 premiers cycles exclusivement. Une  $S_{ADN}$  sera dite positive pour le test 18S uni si le Ct (Cycle threshold, cycle seuil) moyen généré est dans une gamme de Ct acceptable, préalablement déterminée expérimentalement par le laboratoire, sur ce type de matrice (feuilles de *Musa spp.*) dans ses propres conditions. *Dans les conditions de développement et de validation de ce test, la valeur maximale acceptable de Ct pour le test 18S uni a été déterminée à 12,4 (Dossier LNR de validation de la méthode MOA035).*
- **Un témoin négatif de processus (T-PROC) ou un témoin négatif d'extraction (T-extr.)** sera préparé pour toute série d'extractions. Une prise d'échantillon "vide" (= "T-extr."), c'est à dire un microtube vide de lysing matrix A de 2 mL stérile, subira donc toutes les phases de l'analyse



(prise d'essai-broyage-extraction-PCR) pour vérifier l'absence de contamination lors de la prise d'essai et de la phase d'extraction d'ADN (1er type de faux positif). Il est possible de remplacer cet échantillon vide par un échantillon de feuille de bananier reconnu non contaminé par *P. fijiensis* (témoin négatif de processus, T-<sub>PROC</sub>). L'un ou l'autre sera testé en *duplicata* lors de chaque réaction de PCR en temps réel MFB-F/-Rtaq/-P pour vérifier l'absence de contamination croisée entre échantillons ou de contamination externe lors de la phase d'extraction d'ADN.

- **Un témoin positif T+<sub>18S Musa</sub>** sera systématiquement testé en *duplicata* lors de chaque réaction de PCR en temps réel 18S uni. Il permet de vérifier que la réaction PCR 18S uni s'est effectuée de façon correcte. Ce T+<sub>18S Musa</sub> est constitué d'une solution calibrée de plasmides bactériens dans lesquels est insérée la cible du test PCR 18S uni-F/-R/-P obtenue à partir d'ADN de bananier, ou d'une solution d'ADN de bananier à une concentration similaire à ce qui est obtenu en moyenne à partir d'échantillons à analyser.
- **Un témoin positif en limite pratique de détection (T+<sub>LOD</sub>)** sera systématiquement testé en *duplicata* lors de chaque réaction de PCR en temps réel MFB-F/-Rtaq/-P. Il permet de vérifier que la réaction PCR s'est effectuée de façon optimale (conditions thermodynamiques, volumétriques, et chimiques) pour que la plus petite quantité détectable de *P. fijiensis* puisse avoir été détectée dans un échantillon par ce protocole. Ce T+<sub>LOD</sub> est constitué d'une solution calibrée d'ADN génomique d'une souche référencée de *P. fijiensis* ou d'une solution calibrée de plasmides bactériens dans lesquels est insérée la cible du test PCR MFB-F/-Rtaq/-P. En pratique, le T+<sub>LOD</sub> peut être défini comme la plus petite quantité de cible produisant un résultat positif dans 100 % des cas. Ce T+<sub>LOD</sub> doit être caractérisé par le laboratoire dans ses propres conditions. *Dans les conditions de développement et de validation de ce test, la limite de détection du test a été déterminée à 11,9 copies plasmidiques de cible par tube de PCR (Dossier LNR de validation de la méthode MOA035)*
- **Un témoin négatif d'amplification (T- ou NTC, no template control)** sera systématiquement introduit en *duplicata* lors de chaque réaction de PCR en temps réel MFB-F/-Rtaq/-P. Une prise d'échantillon "eau" subira donc toutes les phases de l'analyse à partir de la préparation du mélange réactionnel de PCR pour vérifier l'absence de contamination lors de cette phase et lors du chargement des S<sub>ADN</sub> dans les tubes individuels de PCR (2<sup>ème</sup> type de faux positifs).
- **Un témoin de spécificité** correspondant à *P. musicola*, espèce fréquente sur bananier et proche phylogénétiquement de *P. fijiensis*. sera testé en *duplicata* lors de chaque réaction de PCR en temps réel MFB-F/-Rtaq/-P. Il s'agit d'un témoin négatif permettant de vérifier que les conditions de stringence durant la PCR sont optimales et préviennent une amplification non spécifique. T+ *musicola* correspond à une solution d'ADN génomique d'une souche référencée de *P. musicola* ou à une solution de bactéries contenant un plasmide dans lequel est insérée la région homologue de la  $\beta$ tubuline chez cette espèce.

Ces contrôles ainsi que des contrôles supplémentaires que le laboratoire peut ajouter si nécessaire sont définis par la MOA 022.



## 6. Appareillage et matériels

**Avertissement :** Des appellations commerciales ou fournisseurs peuvent être mentionnées dans le descriptif des appareils et matériels 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 matériels. Des matériels équivalents peuvent être utilisés s'il est démontré qu'ils conduisent aux mêmes résultats.

L'agencement et l'équipement des zones de travail sont définis dans la MOA22.

Les matériels utilisés dans la méthode doivent satisfaire aux exigences de la MOA 022 en vigueur.

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 < à 10mL : EMT = $\pm 10\%$
Température	incubateur : EMT = $\pm 3^{\circ}\text{C}$ réfrigérateur : $5^{\circ}\text{C}$ et EMT = $\pm 4^{\circ}\text{C}$ (ou plus strict en fonction des recommandations fournisseur) congélateur : $\leq -18^{\circ}\text{C}$ en fonction de l'usage thermocycleur* : EMT justesse = $\pm 1^{\circ}\text{C}$ ; EMT homogénéité = $\pm 2^{\circ}\text{C}$

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

En plus de l'appareillage courant d'un laboratoire de biologie moléculaire, le matériel suivant est jugé nécessaire pour certaines phases de l'analyse:

- Appareil de PCR en temps réel et ordinateur de pilotage capables de mesurer la fluorescence des reporteurs de type « FAM » et « JOE » ou des fluorophores de spectre équivalent. Cette méthode a été caractérisée et validée sur un appareil Rotorgene 6000, Corbett Research.
- Poste de sécurité microbiologique pour la préparation des prises d'essai.
- Broyeur de tissu orbital oscillant (de type Fastprep, MP Biomedicals) avec adaptateur et portoirs pour tubes de 2 mL.
- Hotte à flux laminaire ou poste de sécurité microbiologique pour préparation du mélange réactionnel et chargement des échantillons dans les tubes de PCR (si possible deux hottes ou postes séparés).



## 7. Échantillons

### 7.1 Conditions d'acceptation des échantillons

Pour que les échantillons soient acceptés sans réserve, les éléments suivants doivent être respectés :

Nature et état de l'échantillon compatibles avec l'analyse : Les échantillons sont constitués d'au moins un fragment de tissu foliaire, de préférence inférieure à 25 x 20 cm, présentant plusieurs lésions (cf. Annexe 1). Le temps entre le prélèvement et l'arrivée au laboratoire doit être le plus réduit possible. Si les échantillons ne sont pas envoyés le jour même, ils doivent être conservés au froid avant l'envoi.

Confection du colis : Chaque échantillon est conditionné individuellement dans du papier journal (ou du papier absorbant) puis dans un emballage hermétique parfaitement identifié (référence figurant sur la fiche de demande d'analyse). Toutes les mesures doivent être prises pour conserver l'intégrité de l'échantillon et éviter les contaminations par d'autres échantillons. Une signalétique de type « quarantaine » doit figurer sur le colis dans les cas où l'échantillon doit être pris en charge dans des conditions confinées.

Fiche de demande d'analyse : formulation claire de la demande, marchandise consignée ou non, identification du végétal, de l'expéditeur, référence des échantillons. Cette fiche est fixée à l'extérieur du colis.

### 7.2 Conservation des échantillons avant analyse

Le délai entre la réception de l'échantillon et le début effectif de l'analyse doit être inférieur à 15 jours. L'échantillon devra pendant ce temps être conservé à  $\pm 5^{\circ}\text{C}$ . Les prises d'essai en microtubes peuvent être conservées congelées jusqu'à 3 mois avant analyse.

### 7.3 Conservation des échantillons ou reliquats après analyse

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, au minimum jusqu'au 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. Dans le cadre des missions qui lui sont confiées, le laboratoire national de référence peut demander que tout ou une partie de ces reliquats lui soient transmis, aux frais des laboratoires agréés ou reconnus.



## 8. Mode opératoire

### 8.1 Préparation des échantillons pour analyse

La préparation des échantillons pour analyse s'effectue sous un poste de sécurité microbiologique. Chaque échantillon est traité individuellement. Les outils sont stérilisés (ex. : passés à la flamme puis refroidis) entre chaque échantillon.

La prise d'essai s'effectue sur des feuilles présentant des symptômes typiques d'une infection par *P. fijiensis* ou éventuellement des symptômes douteux.

➤ cf. annexe 1 : Symptômes de *Pseudocercospora fijiensis*

Les prélèvements de tissu foliaire s'effectuent sur les lésions observées en utilisant des outils coupants stérilisés. Pour un échantillon donné, cibler les régions contenant les lésions et prélever autant de lamelles de tissu que nécessaire afin de maximiser les chances de détecter le parasite.

Les lamelles de tissu sont découpées à l'aide d'une lame de scalpel stérilisée, en tronçons les plus petits possible (environ 2 à 3 mm d'arête). Ces tronçons sont ensuite mélangés puis transférés dans un microtube de 2 mL (lysing matrix A) en veillant à ne pas dépasser un volume représentant environ un quart du tube. A cette étape, si possible, un tube supplémentaire contenant le reste des nécroses est préparé puis conservé congelé en cas de nécessité de confirmation des cas positifs par un laboratoire de référence.

### 8.2 Broyage des prises d'essai et extraction de l'ADN total

L'objectif du broyage de la prise d'essai est de permettre son homogénéisation et de faciliter la libération d'un maximum d'ADN total lors de l'incubation dans le tampon de lyse.

1. Déposer et ouvrir le tube faisant office de témoin d'extraction sur le plan de travail pendant toute la durée de la manipulation des échantillons.
2. Avant ouverture du microtube contenant la prise d'essai, centrifuger brièvement le microtube afin de précipiter toutes les particules constituant l'échantillon au fond du microtube et débarrasser les capuchons de tout reliquat d'échantillon.
3. Ajouter le volume de tampon de lyse préconisé par le fabricant de kit d'extraction d'ADN dans chaque tube de prise d'essai. Si un dosage d'ADN au spectrophotomètre est prévu, il sera parfois nécessaire à cette étape d'ajouter la RNase, enzyme qui dégrade les molécules d'ARN. Le volume à ajouter est celui préconisé par le fabricant (fournie avec le kit d'extraction).
4. Ajouter 10 à 20 mg de PVPP en poudre.
5. Placer le microtube sur le portoir du broyeur et broyer environ 1 minute à une fréquence d'agitation de 6,5 unités (m/s). Recommencer cette étape une deuxième fois.
6. Centrifuger le microtube quelques secondes après le broyage pour recueillir l'échantillon au fond du tube et réduire la mousse.
7. Incuber chaque tube pendant environ 15 à 20 minutes à environ 65°C (ou à température préconisée par le fabricant de kits d'extraction d'ADN). Pendant l'incubation, vortexer chaque tube à au moins une reprise pour ré-homogénéiser leur contenu qui aura tendance à sédimenter.





8. A la fin de l'incubation, centrifuger les tubes environ 5 min à une vitesse maximale permettant de culotter les débris cellulaires. Prélever le surnageant pour poursuivre l'extraction.
9. Le surnageant prélevé est transféré dans un nouveau microtube stérile ou dans la première colonne de filtration du kit d'extraction d'ADN. Le microtube contenant le culot cellulaire est détruit. L'extraction d'ADN se poursuit ensuite en suivant les recommandations du fournisseur du kit d'extraction d'ADN.

A la fin du mode opératoire prescrit par le fabricant, l'ADN total extrait est élué dans un volume final de 100µL de tampon d'éluion. Cette solution d'ADN total ( $S_{ADN}$ ) constituera la solution (extrait) d'ADN directement analysée par PCR en temps réel.

### 8.3 Test de détection par PCR en temps réel duplex

#### Préparation et distribution du mélange réactionnel de détection MFB-F/-Rtaq/-P

Le volume réactionnel est 20µL : 18µL de mélange réactionnel et 2µL de  $S_{ADN}$  à tester. La composition du mélange réactionnel est la suivante :

Composé	Concentration finale
Eau Ultra Pure	qsp 18 µL
Mastermix no Rox (Eurogentec)*	1x
Amorce sens MFB F	0.3 µM
Amorce antisens MFBR taq	0.3 µM
Sonde MFB P	0.1 µM
Amorce sens 18S uni-F	0.3 µM
Amorce antisens 18S uni-R	0.3 µM
Sonde 18S uni-P	0.1 µM

\* le pré-mix contient de l'Uracil-N-glycosylase (UNG pour prévenir les autocontaminations provenant des réactions d'amplification précédentes.

1. Le mélange réactionnel se prépare dans un microtube stérile de 1.5 ou 2 mL,
2. Les différents composants sont décongelés à température ambiante puis homogénéisés par vortexage.
3. Les différents composants sont ajoutés au microtube stérile à l'aide de micropipettes obligatoirement munies de microcônes stériles à embout filtre.
4. Le microtube contenant le mélange réactionnel complet doit être passé au vortex pendant au moins 5 secondes avant sa distribution.
5. Le mélange réactionnel est distribué dans les microtubes de PCR à raison de 18 µL par microtube.



### Addition des solutions d'ADN à tester dans les microtubes de PCR

1. Les différentes solutions  $S_{ADN}$  correspondant aux différentes prises d'essai sont testées en *duplicata* (2 tubes ou capillaires PCR individuels) à raison de 2  $\mu$ L par microtube de PCR à l'aide d'une micropipette munie d'un microcône stérile à embout filtre.
2. Les  $S_{ADN}$  des différents contrôles sont ajoutées et testées en *duplicata* :  $T_{-extr}$ ,  $T_{+LOD}$ , etc. Pour le  $T_{-}$ , on substitue à la  $S_{ADN}$  par 2  $\mu$ L d'eau ultra pure. Il est recommandé d'ajouter les témoins positifs en fin de manipulation, après avoir refermé de façon étanche les tubes correspondants aux échantillons à tester.
3. Les microtubes sont transférés dans le bloc ou le rotor du thermocycleur.

### Paramètres de l'amplification par PCR en temps réel MFB-F/-Rtaq/-P

Les différents paramètres de la PCR en temps réel pour la détection de *P. fijiensis* sont les suivants (Arzanlou et al. 2007) :

	Etape	Température de consigne	Durée programmée	Nombre de cycles
0	Activation de l'UNG	50°C*	2 min*	1
1	Dénaturation initiale et activation de la polymérase à ADN	95°C*	10 min*	1
2	Dénaturation	95°C	15 sec	40
3	Hybridation - polymérisation	60°C	60 sec puis mesure de la fluorescence FAM et JOE	

\* Durée et température à adapter en fonction des recommandations du fournisseur

A la fin de l'amplification par polymérisation en chaîne, les tubes de PCR sont évacués et détruits.

## 9. Résultats

### 9.1 Contrôle de la validité des résultats

La validation de l'analyse s'effectue en observant les courbes de fluorescence mesurées par l'appareil de PCR en temps réel et générées à partir des différents témoins.

L'analyse est considérée validée si et seulement si l'ensemble des conditions suivantes est réuni en fin de réaction :





- a) Aucun des deux réplicats de  $T_{-PROC}$  ou  $T_{-extr}$  n'a généré de fluorescence « FAM » supérieure à la ligne de seuil déterminée ➤ il n'y a pas eu de contamination croisée accidentelle pendant la phase de broyage et d'extraction d'ADN de la série des échantillons analysés ou pendant la préparation du mélange réactionnel, son dépôt et l'ajout des  $S_{ADN}$ .
- b) Aucun des deux réplicats de T- (NTC) n'a généré de fluorescence « FAM » supérieure à la ligne de seuil déterminée ➤ il n'y a pas eu de contamination accidentelle pendant la préparation du mélange réactionnel, son dépôt et l'ajout des  $S_{ADN}$ .
- c) Aucun des deux réplicats du témoin de spécificité,  $T+_{musicola}$  n'a généré de fluorescence « FAM » supérieure à la ligne de seuil déterminée ➤ Les conditions de stringence ont garanti la spécificité du test.
- d) Les réplicats de  $T+_{LOD}$  ont chacun généré un niveau de fluorescence « FAM » supérieur à la ligne de seuil déterminée ➤ les conditions de PCR et la composition du mélange réactionnel de PCR ont permis d'amplifier spécifiquement et avec une sensibilité optimale la séquence cible chez *P. fijiensis*.

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

## 9.2 Calculs et expression des résultats

Si la série d'analyse est validée, les résultats peuvent être considérés comme interprétables pour l'ensemble des  $S_{ADN}$ , donc des prises d'essai et de leur réplicats, testés au cours de la même réaction de PCR.

Pour chacune des réactions de PCR, relever le Ct du contrôle  $T+_{LOD}$  (=  $Ct_{LOD}$ ). Tous les extraits d'ADN testés lors de la réaction validée dont le Ct est inférieur à  $Ct_{LOD}$  seront considérés comme positifs.

Pour chaque échantillon analysé, les résultats des  $n$  prises d'essai sont analysés individuellement suivant les règles de décision présentées en annexe 2 (tables décisionnelles). Sur la base de ces résultats le statut de l'échantillon est déterminé comme suit :

- Pour qu'un échantillon soit déclaré positif, il suffit que la prise d'essai soit positive. Le résultat sera exprimé par une phrase du type « *P. fijiensis* détecté dans l'échantillon analysé »
- Pour qu'un échantillon soit déclaré négatif, il faut que la prise d'essai soit négative. Le résultat sera alors exprimé par une phrase du type « *P. fijiensis* non détecté dans l'échantillon analysé » en indiquant le seuil de détection.
- Un échantillon sera déclaré de statut indéterminé si la prise d'essai est de statut indéterminé. Le résultat sera alors exprimé par « résultat indéterminé pour l'échantillon analysé », et il conviendra de mentionner dans les commentaires la cause de l'indétermination (présence de composés inhibiteurs ou quantité d'ADN extrait insuffisante).



## 10. Caractéristiques de performance de la méthode

Critère de performance	Résultats obtenus
<b>Caractéristiques de la réaction de PCR en temps réel</b>	<ul style="list-style-type: none"><li>• <u>Efficacité de réaction sur des solutions plasmidiques</u><ul style="list-style-type: none"><li>- <u>Dilution dans du tampon Te1x</u> : l'efficacité de réaction a été évaluée à 0,88 en réaction monoplex et à 0,90 en duplex ; le seuil de détection de la cible n'est pas affecté par la réaction en duplex d'un point de vue qualitatif ni d'un point de vue quantitatif (décalage d'environ 1 Ct à une concentration proche de la limite de détection) . R2= 0,99.</li><li>- <u>Dilution dans de l'ADN de feuilles de bananier</u>. l'efficacité de réaction en monoplex est de 0,89 et en duplex de 0,74.</li></ul></li><li>Le seuil de détection de la cible n'est pas affecté par la réaction en duplex d'un point de vue qualitatif. Néanmoins, d'un point de vue quantitatif, un décalage d'environ 3 Ct est obtenu à une concentration proche de la limite de détection. R2= 0,99.</li><li>• <u>Efficacité de réaction sur des extraits d'ADN d'échantillons naturellement contaminés</u> (n=18)<ul style="list-style-type: none"><li>La réaction monoplex montre une efficacité significative (Ct moyen : 22,52) par rapport à la réaction duplex (Ct moyen : 28,89).</li><li>Au final, les résultats montrent une perte d'efficacité en réaction duplex. Néanmoins tous les échantillons testés en duplex ont une valeur de Ct inférieure à la limite de détection (fixée à un Ct de 32,32). La réaction duplex n'affecte pas le résultat d'un point de vue qualitatif.</li></ul></li></ul>
<b>Sensibilité analytique</b>	La concentration correspondant à la limite de détection (plus faible concentration produisant 100% de résultats positifs) a été fixée à 1,19.10e2 copies plasmidiques par tube de PCR pour une réaction duplex MFB-F/-RTaq/-P avec dilution dans du TE1x.
<b>Spécificité analytique</b>	<p>La spécificité analytique du test a été évaluée :</p> <ul style="list-style-type: none"><li>• in silico et in vitro avec succès sur une gamme de différentes espèces de la famille des Mycosphaerellacées, génétiquement proches de la cible (3 espèces, 8 isolats) et d'espèces de champignons isolées sur feuilles de bananier (7 espèces, 10 isolats)</li><li>• in vitro sur des extraits d'ADN d'échantillons en provenance de zones potentiellement indemnes de la maladie, en réaction duplex ( MFB-F/-RTaq/-P et 18S uni -F/-R/-P). La spécificité a été confirmée par un test « <i>Pseudocercospora musicola</i> » en réaction duplex MMB-F/-RTaq/FME-P et par un test « <i>Pseudocercospora eumusae</i> » en réaction duplex MEB-F/Taq/-RTaq/FME-P.</li><li>• in vitro sur des extraits d'ADN de solutions plasmidiques de deux espèces proches phylogénétiquement de la cible.</li><li>• in vitro et in silico sur un extrait d'ADN d'échantillon négatif en réaction Qpcr duplex</li></ul> <p>Absence de réaction croisée. Pas de faux positifs à la fois in silico et in vitro.</p>
<b>Inclusivité</b>	<ul style="list-style-type: none"><li>• L'inclusivité du test qPCR a été démontrée in silico par Blast sur la base de données GenBank et in vitro sur des extraits d'ADN d'isolats de <i>Pseudocercospora fijiensis</i> (4).</li><li>• Elle a également été démontrée in vitro et in silico sur des extraits d'ADN d'échantillons contaminés (12) provenant de zones géographiques différentes (3).</li></ul> <p>Toutes les souches de <i>Pseudocercospora fijiensis</i> testées sont détectées par le test, quelle que soit leur origine</p>



Répétabilité et reproductibilité	Cible			Concentration de la cible* (cp/μL)			CV (%)		
				Intra run			Inter run		
	<i>P. fijiensis</i>								
MFB-F/-RTaq	1,189.10e2			2,67			2,37		
	1,189.10e3			0,93			1,54		
	1,189.10e4			0,39			2,04		
<i>ADN de</i>									
<i>P.fijiensis</i>	n.d.**			3,26			neg***		
* Plasmides dans lesquels est insérée la région MFB-F/MFB-RTaq, dilués dans du Tris Edta 1x.									
** Extrait d'ADN d'un échantillon naturellement contaminé (09-1867/9 pour le test intra run)									
*** Extrait d'ADN dégradé									
• La répétabilité qualitative et la reproductibilité qualitative sont à 100%.									
Robustesse	Le tableau ci-dessous présente les résultats de robustesse obtenus (variation du volume réactionnel, du volume d'ADN template et de la température d'hybridation)								
	Paramètres			Moyenne Ct (±SD)*					
	Volume réactionnel			18 μL		20 μL		22 μL	
			30,47±0.62 <sup>a</sup>		30,76±0.36 <sup>a</sup>		30,74±0.36 <sup>a</sup>		
Volume d'extrait d'ADN testé			1.8 μL		2.0 μL		2.2 μL		
			30.06±0.23 <sup>a</sup>		29.69±0.67 <sup>a,b</sup>		29.77±0.31 <sup>b</sup>		
Température d'hybridation	Concentration de la cible*	57°C		60°C		63°C			
<i>P. fijiensis</i>									
MFB-F/-RTaq	1,189.10e2		32,13±0,68 <sup>a</sup>		31,1±0,44 <sup>b</sup>		30,74±0,48 <sup>b</sup>		
	1,189.10e4		29,18±0,26 <sup>a</sup>		28,1±0,15 <sup>b</sup>		28,14±0,33 <sup>b</sup>		
<i>ADN de</i>									
<i>P. fijiensis</i>	n.d.**		33,2±0,62		27,71±0,33		22,34±0,06		
<i>P. fijiensis</i>	n.d.**		neg		34,13±1,19		22,85±0,3		
* Plasmides dans lesquels sont insérés la région MFB-F/MFB-RTaq, dilués dans du Tris Edta 1x.									
** Extrait d'ADN d'un échantillon naturellement contaminé (12-16/1)									
Pas d'effet significatif de la variation du volume réactionnel sur la valeur moyenne de Ct.									
En revanche, la variabilité du volume de la solution d'ADN testée (1,8μL) et la variation de la température d'hybridation (57°C pour les extraits d'ADN cible, 57°C et 60°C pour les extraits d'ADN d'échantillons naturellement contaminés) induisent des variations de sensibilité significatives.									
Même si la valeur moyenne de Ct générée à 60°C est significativement supérieure à celle générée à 63°C, elle est toutefois interprétée avec le même résultat qualitatif (i.e. positif).									




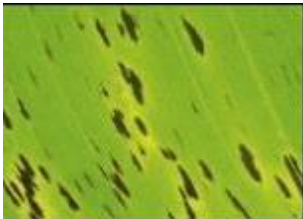



<b>Sensibilité relative</b>	La comparaison de cette méthode de PCR en temps réel (Arzanlou et al., 2007) avec les méthodes i) par observation <i>in situ</i> (Zapater et al. 2008), ii) par isolement mycologique et caractérisation morphologique (Zapater et al., 2008), et iii) par PCR conventionnelle (Arzanlou et al. 2007) a été effectuée avec des échantillons de statut sanitaire inconnu. Les 4 méthodes ont été comparées par l'analyse d'un large panel d'échantillons potentiellement contaminés par <i>Pseudocercospora fijiensis</i> . La comparaison des différentes techniques a été évaluée par un test de Khi2.
<b>Spécificité relative</b>	
<b>Exactitude relative</b>	Au final, cette étude a démontré: - le manque de spécificité (faux positifs) et le manque de sensibilité (faux négatifs) de la PCR conventionnelle (Arzanlou et al., 2007)) - une meilleure spécificité et sensibilité de la méthode en réaction PCR temps réel (Arzanlou et al., 2007)
<b>Autres critères : Multiplexage</b>	Pour des solutions plasmidiques, le seuil de détection de la cible n'est pas affecté par la réaction en duplex d'un point de vue qualitatif. Néanmoins, d'un point de vue quantitatif, un décalage d'environ 3 Ct est obtenu à une concentration proche de la limite de détection. R2= 0,99.  Pour des extraits d'ADN d'échantillons naturellement contaminés, la réaction monoplex montre une sensibilité significativement inférieure (Ct moyen : 22,52) à celle de la réaction duplex (Ct moyen : 28,89). Cependant, tous les échantillons contaminés testés ont généré une valeur de Ct inférieure à la limite de détection, donc n'induisant pas de risque de faux négatifs.
<b>Autres critères : Prélèvements</b>	<ul style="list-style-type: none"><li>• Les valeurs de Ct moyen obtenues pour des prises d'essai successives par échantillon (une prise d'essai par lésion foliaire typique d'une infection par <i>Pseudocercospora fijiensis</i>) montrent qu'il peut exister des différences parfois significatives de Ct entre les prélèvements (coefficient de variation <math>\leq 15\%</math>) mais le résultat n'est jamais affecté d'un point de vue qualitatif.</li><li>• La moyenne des valeurs de Ct obtenues sur des prélèvements de lésions foliaires symptomatiques pertinents de stade « nécrose » puis sur des prélèvements de lésions foliaires symptomatiques pertinents de stade « tirets noirs » ont été comparées par un test de Fisher. L'évaluation a été effectuée sur 11 échantillons présentant les 2 types de symptômes.</li></ul> L'analyse du résultat montre qu'il n'y a pas de différence significative entre ces deux types de prélèvements.  De plus, le résultat n'est pas affecté d'un point de vue qualitatif (positif/négatif). En effet tous les échantillons testés ont une valeur de Ct moyen inférieure à la limite de détection (fixée à un Ct de 32,32).
<b>Autres critères : Durée d'analyse</b>	Durée estimée de la méthode qPCR : 1 journée
<b>Autres critères : Contrôle de la qualité d'extraction d'ADN</b>	Afin de valider la qualité d'un extrait d'ADN, une valeur maximale acceptable de Ct a été établie pour le test PCR 18S uni (test de contrôle de la qualité de l'ADN extrait). Ce seuil a été déterminé à 12,4 sur une série de 60 valeurs de Ct. Ces valeurs ont été obtenues à partir de feuilles de bananier potentiellement contaminées par la cible, avec le kit qPCR Mastermix No Rox (Eurogentec) sur un appareil Rotorgene 6000 (Corbett Research).



## Annexe 1 : Symptômes de *Pseudocercospora fijiensis*

### Les 6 stades évolutifs de la maladie des raies noires

<p><b>Stade 1-</b> Sur la face inférieure de la feuille apparaissent de petits et très discrets tirets jaunes.</p>	 <p>Catherine Abadie- Cirad Guadeloupe</p>
<p><b>Stade 2-</b> Ces tirets s'allongent et s'élargissent pour former des tirets jaunes à marron.</p> <p><b>Stade 3-</b> Les tirets continuent de s'allonger et changent de couleur devenant brun foncé à noir. Ils sont visibles sur les deux faces de la feuille.</p>	 <p>Catherine Abadie- Cirad Guadeloupe</p>
<p><b>Stade 4-</b> Les tirets s'élargissent en taches elliptiques entourées d'une zone marron clair.</p>	 <p>Catherine Abadie- Cirad Guadeloupe</p>
<p><b>Stade 5-</b> Le centre noir des taches se nécrose et s'entoure d'un halo jaunâtre.</p>	 <p>Catherine Abadie- Cirad Guadeloupe</p>
<p><b>Stade 6-</b> Le centre des taches se dessèche, s'entoure d'un anneau noir, cerclé d'un halo jaune vif.</p>	 <p>Catherine Abadie- Cirad Guadeloupe</p>



## Annexe 2 : Tables décisionnelles

	Type résultat	Prise d'essai	Action	Interprétation / démarche à suivre
Test <i>P. fijiensis</i>	1	+/+	FIN	<b><i>P. fijiensis détecté dans l'échantillon</i></b>
	2	+/-	Refaire test <i>P. fijiensis</i> sur S <sub>ADN</sub>	Suite au nouveau test <i>P. fijiensis</i> : <ul style="list-style-type: none"> <li>• Si résultat type 1 obtenu : <b><i>P. fijiensis détecté dans l'échantillon</i></b></li> <li>• Si résultat type 2 ou 3 obtenu, procéder à l'interprétation des résultats du test 18S uni sur la prise d'essai.</li> </ul>
	3	-/-	Procéder à l'interprétation des résultats du test 18S uni sur S <sub>ADN</sub>	

	Type résultat	Prise d'essai	Action	Interprétation / démarche à suivre
Test 18S uni	1	+/+	FIN	<b><i>P. fijiensis non détecté dans l'échantillon</i></b>
	2	+/-	Refaire le test 18S uni sur S <sub>ADN</sub> diluée au 1/10 <sup>e</sup> dans le tampon d'élution du kit d'extraction d'ADN.	Suite au nouveau test 18S uni : <ul style="list-style-type: none"> <li>• Si résultat type 1 obtenu : <b><i>P. fijiensis non détecté dans l'échantillon</i></b></li> <li>• Si résultat type 2 ou 3 obtenu, <b><i>résultat indéterminé dans l'échantillon pour cause de présence de composés inhibiteurs de PCR.</i></b></li> </ul>
	3	-/-	Refaire le test 18S uni sur S <sub>ADN</sub> diluée au 1/10 <sup>e</sup> dans le tampon d'élution du kit d'extraction d'ADN.	Suite au nouveau test 18S uni : <ul style="list-style-type: none"> <li>• Si résultat type 1 obtenu : <b><i>P. fijiensis non détecté dans l'échantillon</i></b></li> <li>• Si résultat type 2 ou 3 obtenu, <b><i>résultat indéterminé dans l'échantillon pour cause de présence de composés inhibiteurs de PCR.</i></b></li> </ul>



## Bibliographie

Arzanlou, M., E. C. A. Abeln, G. H. J. Kema, C. Waalwijk, J. Carlier, I. d. Vries, M. Guzmán, and P. W. Crous. 2007. Molecular diagnostics for the Sigatoka disease complex of banana. *Phytopathology* 97:1112-1118.

loos, R., C. Fourier, G. Iancu, and T. R. Gordon. 2009. Sensitive Detection of *Fusarium circinatum* in Pine Seed by Combining an Enrichment Procedure with a Real-Time Polymerase Chain Reaction Using Dual-Labeled Probe Chemistry. *Phytopathology* 99:582-590.

loos, R., B. Fabre, C. Saurat, C. Fourier, P. Frey, and B. Marçais. 2010. Development, Comparison, and Validation of Real-Time and Conventional PCR Tools for the Detection of the Fungal Pathogens Causing Brown Spot and Red Band Needle Blights of Pine. *Phytopathology* 100:105-114.

Zapater, M.-F., Abadie, C., Pignolet, L., Carlier, J. & Mourichon, X. (2008) Diagnosis of *Mycosphaerella* spp., responsible for *Mycosphaerella* leaf spot diseases of bananas and plantains, through morphotaxonomic observations. *Fruits* 63 : 389-393.