

Méthode d'analyse en santé des végétaux

RÉFÉRENCE : ANSES/LSV/MA 063 - Version 3

Septembre 2024

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

Laboratoire de la Santé des Végétaux

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

Historique de la méthode

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

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

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

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

Tableau 1 : Historique des versions de la présente méthode.

Version	Nature des modifications (majeure/mineure)	Date	Principales modifications
v1*	Sans objet	Juin 2021	Version initiale
v2	Mineure	Septembre 2021	Les principales modifications portent : -sur le §4 : des précisions ont été apportées au principe de la méthode et notamment sur le contexte d'utilisation des 2 modalités d'extraction. -sur les §7.1 et §8.1 : pour ajouter la possibilité et les conditions de regroupement d'échantillons. Le §9.3 « analyses de confirmation » a par ailleurs été supprimé par souci d'harmonisation avec les autres méthodes officielles en santé végétale.
v3**	Majeure	Septembre 2024	Les principales modifications portent sur : - la modification du schéma de détection pour introduire la réalisation systématique de 2 tests de PCR en temps réel dont les résultats combinés permettent l'interprétation du résultat globalement pour la méthode (§4, §5.2.2.2, §8.6, §9.2.2). L'introduction d'un second test PCR réalisé de façon systématique par rapport à la précédente version de la méthode a pour objectif de réduire le risque de faux positifs et donc de sécuriser les résultats positifs de détection. - le changement de matrice suite au broyage de la prise d'essais ; l'extraction d'acides nucléiques par kit se fait désormais sur le surnageant, permettant une meilleure sensibilité de la méthode (§8.3). - les modalités d'élution de l'ADN, explicitement précisées (§8.3) - l'introduction de la notion de résultat de statut indéterminé, en lien avec 2 valeurs de cut off (§9.2) ; - l'ajout de la possibilité de réactions croisées entre espèce Clas et Claf dans le cadre de l'utilisation en simplex de la PCR de détection Li et al., 2006 ne permettant pas toujours la discrimination entre ces 2 espèces (§4).

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

**La version 3 de cette méthode a fait l'objet d'une consultation du 01/08/2024 au 31/08/2024 sur le site internet de l'agence, notamment auprès des laboratoires agréés français.

Avant-propos

La présente méthode a été développée par :

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

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

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

Contact : saint-pierre.lsv@anses.fr

Les travaux méthodologiques effectués sur la méthode ont donné lieu à un rapport de validation (14/01/2021). Le rapport de validation, ainsi que la méthode ont été revus par des pairs scientifiques, ainsi que l'unité de coordination de la référence du LSV. Des travaux méthodologiques complémentaires ont été réalisés en 2024 permettant de proposer une version 3 de la méthode.

Sommaire

Avant-propos	3
Introduction	6
Avertissements et précautions de sécurité	7
1 Objet et domaine d'application	8
2 Documents de référence	8
3 Termes, sigles et définitions	8
4 Principe de la méthode	9
5 Réactifs	11
5.1 Eau	11
5.2 Réactifs de biologie moléculaire	11
5.2.1 Kit d'extraction d'ADN	11
5.2.2 Amplification moléculaire	11
5.2.2.1 Master mix	11
5.2.2.2 Oligonucléotides	12
5.3 Tampons et solutions.....	12
5.4 Conservation	12
5.5 Autres réactifs et consommables	12
5.6 Contrôles et témoins	13
6 Appareillage et matériels	14
6.1 Broyeur	15
6.2 Thermocycleur pour PCR temps réel	15
7 Échantillons	15
7.1 Conditions d'acceptation des échantillons à réception	15
7.2 Conservation des échantillons avant analyse	15
7.3 Conservation des échantillons après analyse	16
8 Mode opératoire	17
8.1 Préparation des échantillons pour analyse.....	17
8.2 Broyage de l'échantillon végétal	18
8.3 Extraction d'ADN en kit.....	18
8.4 Extraction rapide au NaOH	18

8.5	Test spécifique de détection par PCR en temps réel (Li et al., 2006).....	19
8.5.1	Préparation du mélange réactionnel en multiplex.....	19
8.5.2	Préparation du mélange réactionnel en simplex.....	19
8.5.3	Cycles thermiques PCR temps réel	20
8.6	Test spécifique de détection par PCR en temps réel (Quintana-González de Chaves et al., 2023) 20	
8.6.1	Préparation du mélange réactionnel	20
8.6.2	Cycles thermiques PCR temps réel	20
8.7	Analyse des résultats.....	21
9	Résultats	21
9.1	Contrôle qualité.....	21
9.2	Calculs et expression des résultats.....	21
9.2.1	Pour chaque test de détection en PCR temps réel.....	21
9.2.2	Pour la méthode globalement	23
9.2.3	Formulation des résultats de biologie moléculaire.....	23
10	Caractéristiques de performance de la méthode pour la détection de ‘<i>Candidatus Liberibacter asiaticus</i>’ (Extraction Kit).....	24
11	Caractéristiques de performance de la méthode pour la détection de ‘<i>Candidatus Liberibacter africanus</i>’ (Extraction Kit)	25
12	Caractéristiques de performance de la méthode pour la détection de ‘<i>Candidatus Liberibacter americanus</i>’ (Extraction Kit)	26
	Annexe 1 - Recettes	27
	Bibliographie.....	29

Introduction

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

Trois espèces sont responsables de la maladie du HLB :

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

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

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

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

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

Avertissements et précautions de sécurité

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

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

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

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

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

1 Objet et domaine d'application

Objet :

La présente méthode vise à détecter '*Candidatus Liberibacter asiaticus*', '*Candidatus Liberibacter africanus*' et '*Candidatus Liberibacter americanus*' dans des nervures et pétioles de feuilles de Rutaceae par une technique de biologie moléculaire. Elle repose sur une extraction d'ADN réalisée à partir des nervures et pétioles de feuilles suivie de la réalisation de 2 tests de PCR en temps réel sur les extraits d'ADN et permettant la détection spécifique de '*Candidatus Liberibacter spp.*' provoquant le HLB (Li et al., 2006, Quintana-González de Chaves et al., 2023).

Domaine d'application

La méthode s'applique aux échantillons symptomatiques ou asymptomatiques, frais ou lyophilisés de tissus végétaux (nervures et pétioles) de plantes hôtes de la famille des Rutaceae. Un échantillon individuel pour une masse de 1 g frais ou 0,35 g lyophilisé sera utilisé pour l'analyse et représentera la prise d'essai. Pour chaque échantillon, l'analyse est réalisée sur une prise d'essai composée de matériel végétal prélevé sur l'ensemble des nervures et pétioles selon la masse requise. Le surplus est conservé pour une éventuelle analyse de confirmation. Pour une prise d'essai, une quinzaine de feuilles est généralement suffisant.

2 Documents de référence

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

3 Termes, sigles et définitions

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

Le glossaire MOA GLO 001 reprend les principales définitions. L'attention des lecteurs est attirée sur le fait que les termes intégrés au glossaire ne sont, en règle générale, pas spécifiquement repérés dans le corps de la méthode d'analyse.

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

4 Principe de la méthode

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

Bien que les tests composant la méthode produisent des données quantitatives (valeurs de Cq ou « quantification cycle »), ils sont qualitatifs, c'est à dire qu'ils donnent un résultat du type « positif » ou « négatif ». Un résultat positif indique la présence de l'organisme cible dans une quantité d'échantillon donnée et dans la limite du seuil de détection de la technique employée. Un résultat négatif indique l'absence de l'organisme cible dans une quantité d'échantillon donnée et dans la limite du seuil de détection de la technique employée.

Dans certains cas, une réponse indéterminée peut être obtenue. Les échantillons pour lesquels des résultats indéterminés sont obtenus sont des échantillons pour lesquels la technique ne permet pas de statuer sur la présence ou non de l'organisme recherché.

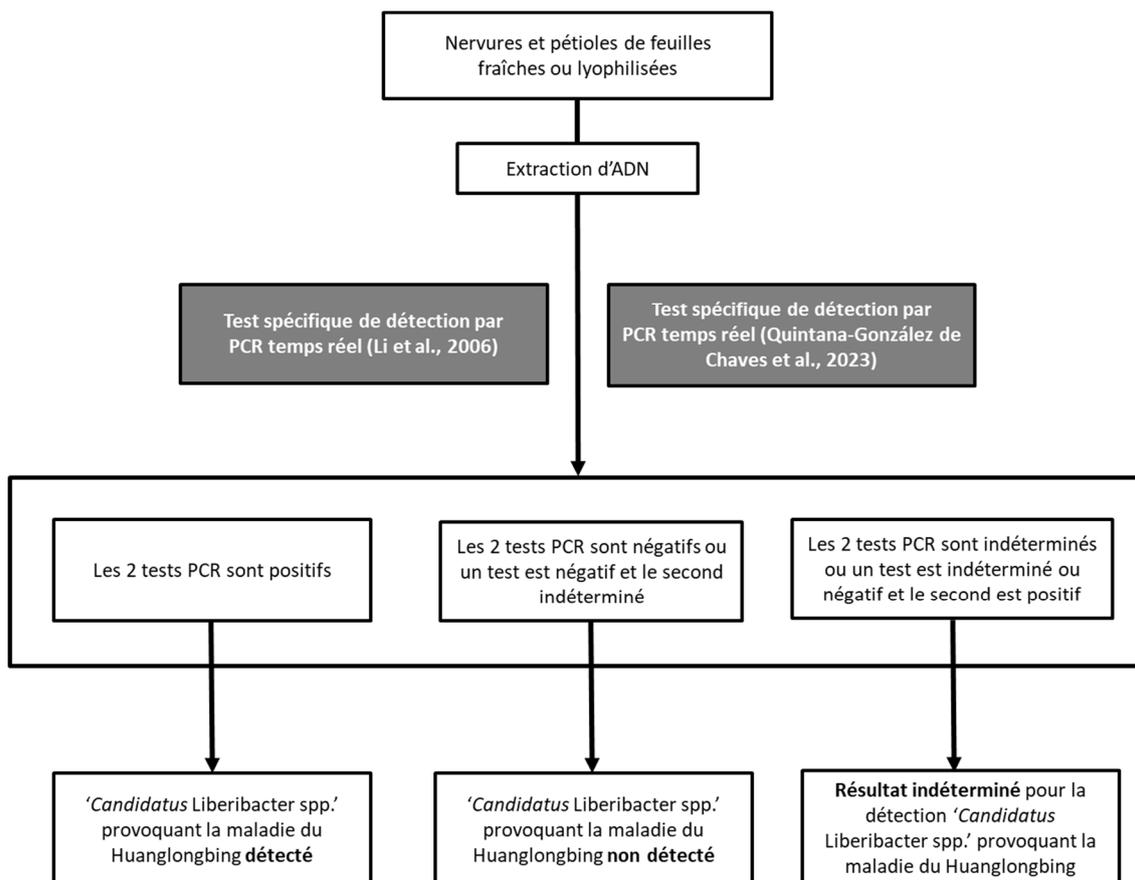


Figure 1 : Schéma de détection et d'identification de *'Candidatus Liberibacter spp.'*, responsable de la maladie du HLB, par la technique PCR en temps réel sur nervures et pétioles de plantes hôtes de la famille des Rutaceae.

Les laboratoires mettant en œuvre la détection des souches pathogènes provoquant la maladie du Huanglongbing doivent mettre en œuvre 2 tests de détection basés sur un principe de biologie moléculaire à partir de l'extraction d'ADN des nervures et pétioles de feuilles :

- Un test de PCR en temps réel (Li et al., 2006) multiplexe basée sur la technologie Taqman et associant 3 amorces « forward » (une spécifique à chacune des 3 espèces de '*Candidatus Liberibacter*' spp. responsable du HLB) et une seule amorce « reverse » commune à chacun des 3 couples ainsi qu'une sonde unique. On notera également qu'une utilisation de la PCR temps réel en simplexe est également possible pour déterminer l'espèce. Des réactions croisées ont toutefois été observées entre les espèces CLAs et Claf, ne permettant pas toujours la distinction entre ces 2 espèces.
- Un test de PCR en temps réel (Quintana-González de Chaves et al., 2023) basée sur la technologie Taqman et associant 2 amorces et une sonde, capable de détecter les 3 espèces de '*Candidatus Liberibacter*' spp. responsable du HLB.

Pour chacun des 2 tests de PCR en temps réel, les résultats possibles sont les suivants :

- Une amplification PCR temps réel obtenue pour un $Cq \leq 33,0$ implique la détection de '*Candidatus Liberibacter* spp.' responsable de la maladie du Huanglongbing sur plante hôte de la famille des Rutaceae ;
- Une amplification PCR temps réel obtenue pour un Cq tel que $33,0 < Cq \leq 36,0$ implique un statut indéterminé quant à la présence de '*Candidatus Liberibacter* spp.' responsable de la maladie du Huanglongbing sur plante hôte de la famille des Rutaceae.
- Une amplification PCR temps réel obtenue pour un $Cq > 36,0$ ou pas de Cq implique l'absence de détection de '*Candidatus Liberibacter* spp.' responsable de la maladie du Huanglongbing sur plante hôte de la famille des Rutaceae.

Le résultat final de la méthode, est donné par la combinaison des résultats des 2 tests de détection, selon les différentes situations listées dans le tableau 11.

- '*Candidatus Liberibacter* spp.' responsable de la maladie du Huanglongbing sur plante hôte de la famille des Rutaceae est détecté uniquement dans la situation où les 2 tests de détection sont positifs.
- '*Candidatus Liberibacter* spp.' responsable de la maladie du Huanglongbing sur plante hôte de la famille des Rutaceae est non détecté lorsque les 2 tests de détection sont négatifs ou lorsqu'un des tests donne un résultat négatif et le second un résultat indéterminé
- Le résultat de détection de '*Candidatus Liberibacter* spp.' responsable de la maladie du Huanglongbing sur plante hôte de la famille des Rutaceae est considéré comme indéterminé lorsque les 2 tests donnent un résultat indéterminé ou lorsque que l'un des tests donne un résultat positif et le second donne un résultat indéterminé ou négatif.

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

- L'extraction au kit : **elle doit être privilégiée pour une recherche optimale de sensibilité analytique et est obligatoire lorsque les analyses sont faites en regroupement d'échantillons ;**
- L'extraction rapide au NaOH : elle peut être une alternative à considérer dans certains cas particuliers pour l'obtention d'un résultat rapide ou lors de l'analyse de grandes séries d'échantillons. **Toutefois, sa sensibilité analytique étant moindre (risque de faux**

négatifs), elle ne doit être mise en œuvre qu'avec l'accord préalable, explicite et éclairé du demandeur d'analyse.

5 Réactifs

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

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

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

5.1 Eau

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

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

5.2 Réactifs de biologie moléculaire

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

5.2.1 Kit d'extraction d'ADN

La présente méthode a été caractérisée et validée en extrayant et purifiant l'ADN total de l'échantillon à l'aide du kit DNeasy® Plant mini kit de Qiagen, en suivant le protocole d'extraction « Plant Tissue » du fournisseur, en commençant par l'étape décrite dans le manuel : « Déposer 400 µL de tampon AP1 et 4 µL de RNase A dans chaque tube... » **à la différence que le dépôt de 400 µL de tampon AP1 est remplacé par 400 µL de surnageant** (obtenu selon les modalités précisées au §8.3) auxquels sont ajoutés 4 µL de RNase A.

5.2.2 Amplification moléculaire

5.2.2.1 Master mix

Le protocole a été caractérisé et validé avec le mélange réactionnel du kit GoTaq® Probe qPCR Master Mix de Promega (Madison, WI, USA), contenant 2 µL de référence passive CXR pour un

tube de 1 mL de Master Mix. Le volume d'ajout de CXR est dépendant du type de thermocycleur utilisé (voir protocole fournisseur) et doit être ajusté au matériel concerné.

5.2.2.2 Oligonucléotides

Amorces et sonde utilisées dans l'amplification moléculaire spécifique par PCR en temps réel (Li et al., 2006):

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

Cible amplifiée : ARN ribosomal 16S.

Amorces et sonde utilisées dans l'amplification moléculaire spécifique par PCR en temps réel (Quintana-González de Chaves et al., 2023) :

- CaL rpoB-F 5' CCTGYAAACCYTCATTAGGACG 3'
- CaL rpoB-R 5' TTGTGTTCAATGGTCTCGGGCGTG 3'
- CaL rpoB-p 5' **FAM**-AGATCAGGTATGTCAATTATCTCAGG-ZNA4-**BHQ1** 3'

Cible amplifiée : RNA polymérase beta subunit *rpoB*.

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

A noter que les sondes ZNA4 peuvent nécessiter des fabrications à façon, impliquant de prendre contact avec le fournisseur de sondes, en dehors de l'interface classique de commande (c'est par exemple le cas pour le fournisseur Eurogentec).

5.3 Tampons et solutions

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

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

5.4 Conservation

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

5.5 Autres réactifs et consommables

Consommables à usage unique

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

Solution hydro-alcoolique de titre alcoolique au moins égal à 70% (et éventuellement un produit détergent désinfectant de type Aniospray) : désinfection des surfaces de travail et du matériel lors des étapes de prise d'essai et de broyage.

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

Sachets de broyage avec filtre.

5.6 Contrôles et témoins

La technique de détection de régions cibles d'ADN d'un organisme par la technique de PCR en temps réel requiert l'utilisation d'une série de contrôles et témoins permettant de valider la bonne qualité de la manipulation. Ces contrôles et témoins ont différentes fonctions et leur utilisation permet de garantir que :

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

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

- Un **témoin négatif de processus** (E-) : matrice (nervures et pétioles de feuilles ou feuilles entières) ne contenant pas l'organisme, traitée dans les mêmes conditions que les échantillons à analyser, déclarée non contaminée à l'issue de la manipulation.
- Un **témoin positif de processus** (E+) : matrice (nervures et pétioles de feuilles infectées ou feuilles entières infectées) contenant l'organisme cible (une des trois espèces cibles de '*Candidatus Liberibacter spp.*' provoquant la maladie du Huanglongbing), traitée dans les mêmes conditions que les échantillons à analyser, déclarée contaminée à l'issue de la manipulation. Il donne au minimum l'assurance d'un déroulement correct de la manipulation. Pour chaque série d'analyses, on peut utiliser un échantillon de référence naturellement ou artificiellement contaminé.
- Un **témoin négatif de PCR** (A-) : il contient tous les éléments du mélange réactionnel mais aucun extrait d'ADN n'est ajouté, uniquement de l'eau ; cela permet de vérifier l'absence de contamination au cours de la réaction de PCR.
- Un **témoin positif de PCR** (A+) (il s'agit d'un témoin de PCR contenant la séquence d'ADN cible de CLas, CLaf ou CLam). Un seul témoin positif de PCR est nécessaire pour la validation de l'amplification moléculaire. Ce type de témoin n'est pas obligatoire mais est conseillé en complément du témoin positif de processus. Il peut notamment être préparé à une concentration proche du seuil de détection afin de permettre la détection de petites anomalies de déroulement du test, susceptibles d'entraîner la non-détection d'échantillons faiblement infectés.

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

6 Appareillage et matériels

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

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

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

Tableau 2 : EMT par grandeur.

Grandeur	EMT
Volume	Se référer à la norme ISO8655 ou utiliser les EMT suivantes : Volume < 10 mL : EMT = ± 10% Volume ≥ 10 mL : EMT = ± 5%
Masse	EMT = ± 10%
pH	EMT = ± 0,3 unité pH
Température	Incubateur : EMT = ± 3°C Réfrigérateur : EMT = ± 4°C (pour une température cible de +5°C) Congélateur : ≤ -18°C Congélateur froid intense : ≤ -65°C Bain thermostaté : EMT = ± 3°C Thermocycleur* : EMT justesse = ± 1°C ; EMT homogénéité = ± 2°C
Temps	EMT = ± 10%

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

6.1 Broyeur

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

6.2 Thermocycleur pour PCR temps réel

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

7 Échantillons

7.1 Conditions d'acceptation des échantillons à réception

Pour les analyses sur plante hôte de la famille des Rutaceae, le laboratoire réalise l'analyse à partir d'une prise d'essai de 1 g de matériel végétal frais ou 0,35 g de matériel végétal lyophilisé ; en dessous de cette quantité de matériel végétal, des réserves sont émises quant au résultat d'analyse si ce dernier est négatif.

Les nervures et pétioles pour analyse doivent arriver au laboratoire dans un état de fraîcheur approprié, non altérées par une décomposition des tissus ou autre. Les échantillons peuvent être sous forme de tissus frais ou lyophilisés, en feuilles entières ou en nervures et pétioles excisés.

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

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

7.2 Conservation des échantillons avant analyse

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

7.3 Conservation des échantillons après analyse

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

Ce délai imposé est destiné à laisser le temps au demandeur de l'analyse de contester le résultat auprès du laboratoire (ce qui prolonge la conservation du reliquat jusqu'à l'issue de la contestation) et éventuellement de demander une analyse contradictoire ou une analyse de confirmation.

Tableau 3 : Type de reliquats d'échantillons à conserver et conditions de leur conservation pour les besoins d'analyses contradictoires et /ou de confirmation.

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

8 Mode opératoire

8.1 Préparation des échantillons pour analyse

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

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

La prise d'essai est réalisée en trois étapes :

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

Notes générales :

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

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

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

8.2 Broyage de l'échantillon végétal

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

8.3 Extraction d'ADN en kit

A l'issue du broyage TRIS/EDTA/SDS (Annexe 1) et de la phase de libération, les échantillons sont centrifugés à environ 8 000 g pendant environ 5 min, afin de culoter les débris végétaux. Les échantillons sont centrifugés à température ambiante. Transférer environ 400µL de surnageant dans un nouveau tube en veillant à ne pas perturber le culot, puis poursuivre les étapes ultérieures d'extraction d'ADN sur cette phase liquide.

Remarque 1 : Le tube contenant le culot et le reliquat de surnageant peut être conservé à une température $\leq -18^{\circ}\text{C}$ pour une utilisation ultérieure si besoin.

Remarque 2 : Dans le cas d'un traitement différé de l'échantillon centrifugé, une fois le surnageant transféré dans un nouveau tube, il est possible de conserver les échantillons à une température $\leq -18^{\circ}\text{C}$ pendant plusieurs semaines en attente de l'extraction.

L'extraction d'ADN est réalisée avec un kit commercial (cf.§5.2.1) selon les recommandations du fournisseur.

La première étape s'effectue sur les 400µL de surnageant issu de l'étape précédente avec ajout directement de 4µL de RNase. L'élution de l'ADN total se fait dans 200µl (à titre indicatif 2 x 100µl).

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.

Après utilisation, les tubes contenant les extraits d'ADN sont conservés selon les modalités indiquées dans le tableau 3.

8.4 Extraction rapide au NaOH

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

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

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

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

8.5.1 Préparation du mélange réactionnel en multiplex

Tableau 4 : Mélange réactionnel de la PCR temps réel Li et al., 2006 utilisée en multiplex.

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

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

Remarques :

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

8.5.2 Préparation du mélange réactionnel en simplex

Tableau 5 : Mélange réactionnel de la PCR temps réel Li et al., 2006 utilisée en simplex.

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

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

Remarques : Voir remarques du 8.5.1

8.5.3 Cycles thermiques PCR temps réel

Tableau 6 : Programme d'amplification de la PCR temps réel Li et al., 2006.

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

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

8.6 Test spécifique de détection par PCR en temps réel (Quintana-González de Chaves et al., 2023)

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

8.6.1 Préparation du mélange réactionnel

Tableau 7 : Mélange réactionnel de la PCR temps réel Quintana-González de Chaves et al., 2023.

Réactifs	[Ci]	[Cf]	Volume par puits
Eau	/	/	3,096
Primer CaL rpoB-F	10 µmol/L	0,50 µmol/L	0,650
Primer CaL rpoB-R	10 µmol/L	0,50 µmol/L	0,650
Sonde CaL rpoB-P	10 µmol/L	0,08 µmol/L	0,104
GoTaq® Probe qPCR Master Mix (Promega) avec CXR	2 X	1 X	6,500
ADN	/	/	2,000
Total			13,000

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

Remarques :

- Le volume final est de 13 µL dans chaque puits soit 11 µL de mélange réactionnel et 2 µL d'ADN ou d'eau (dans le cadre du témoin négatif de PCR) ;
- Établir soigneusement le plan de distribution (plan de plaque ou équivalent) et d'identification des extraits. Chaque échantillon et témoin de processus est déposé deux fois soit deux puits par échantillon. Les témoins d'amplification peuvent ne faire l'objet que d'un seul puits.

8.6.2 Cycles thermiques PCR temps réel

Tableau 8 : Programme d'amplification de la PCR temps réel Quintana-González de Chaves et al., 2023.

Étapes	Température (°C)	Durée	Cycles
Dénaturation initiale	95	10 min	
Dénaturation	95	15 s	40
Hybridation / Elongation *	60	1 min	

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

8.7 Analyse des résultats

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

9 Résultats

9.1 Contrôle qualité

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

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

Tableau 9 : Résultats attendus pour les différents témoins utilisés en PCR en temps réel.

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

*La duplication de ces témoins est facultative.

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

9.2 Calculs et expression des résultats

9.2.1 Pour chaque test de détection en PCR temps réel

Si la série d'analyse est validée, les résultats peuvent être considérés comme interprétables pour l'ensemble des prises d'essai et de leurs répliquats, testés au cours de la même réaction de PCR.

Les règles de cut-off applicables sont présentées ci-après :

$Cq \leq 33,0$ Positif

$33,0 < Cq \leq 36,0$ Indéterminé

$Cq > 36,0$ Négatif

Le résultat d'un puits PCR est positif pour la détection de '*Candidatus Liberibacter*' spp. responsable de la maladie du HLB s'il présente une courbe de fluorescence exponentielle, présentant une intersection avec la ligne seuil et un $Cq \leq 33,0$.

Le résultat d'un puits PCR est négatif s'il ne présente pas de courbe de fluorescence ou s'il ne présente pas de Cq ou s'il présente une courbe non exponentielle ou s'il présente une courbe présentant une intersection avec la ligne seuil et un $Cq > 36,0$.

Le résultat d'un puits PCR est indéterminé pour la détection de '*Candidatus Liberibacter*' spp. responsable de la maladie du HLB s'il présente une courbe de fluorescence exponentielle, présentant une intersection avec la ligne seuil et un Cq tel que $33,0 < Cq \leq 36,0$.

Les résultats du test PCR basés sur les résultats obtenus pour les 2 puits PCR correspondant, s'interprètent de la manière suivante :

Tableau 10 : Interprétation des résultats pour chaque test de PCR en temps réel.

Résultat par puits PCR		Résultat du test PCR
Puits 1	Puits 2	
+	+	POSITIF
+	NP	INDETERMINE
-	NP	NÉGATIF
Ind.	Ind.	INDETERMINE

Ind. correspond à un résultat indéterminé ; NP correspond à un résultat non positif, donc soit négatif soit indéterminé.

On notera qu'une vigilance particulière est à accorder à l'homogénéité des résultats entre les 2 puits PCR d'un même échantillon. Si un écart inhabituel est observé entre les valeurs de Cq des répliqués d'un même échantillon (par exemple un écart-type $\geq 1,5$ associé à un changement de statut qualitatif entre les 2 puits), une erreur de manipulation peut être suspectée et il est préférable de réitérer la PCR en temps réel pour cet échantillon pour écarter toute erreur de manipulation. Si, après réitération de la manipulation, une hétérogénéité est à nouveau observée, l'erreur de manipulation pourra être exclue et l'interprétation pourra se faire conformément au tableau 10.

9.2.2 Pour la méthode globalement

Les résultats obtenus globalement pour la méthode s'interprète en combinant les résultats des 2 tests PCR selon les éléments présentés dans le tableau 11 ci-dessous.

Tableau 11 : Interprétation des résultats pour la méthode globalement, combinant les résultats des 2 tests de détection en PCR en temps réel.

		Résultat du test de détection par PCR en temps réel Quintana-González de Chaves et al., 2023		
		POSITIF	NEGATIF	INDETERMINE
Résultat du test de détection par PCR en temps réel Li et al., 2006	POSITIF	POSITIF	INDETERMINE	INDETERMINE
	NEGATIF	INDETERMINE	NEGATIF	NEGATIF
	INDETERMINE	INDETERMINE	NEGATIF	INDETERMINE

9.2.3 Formulation des résultats de biologie moléculaire

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

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

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

Résultat indéterminé : Résultat indéterminé pour la détection de '*Candidatus Liberibacter spp.*' provoquant la maladie du Huanglongbing dans l'échantillon XXX par la méthode ANSES/LSV/MA063.

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

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

Tableau 12 : Synthèse des caractéristiques de performance de la méthode de détection de '*Candidatus Liberibacter asiaticus*' (Extraction Kit).

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

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

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

Tableau 13 : Synthèse des caractéristiques de performance de la méthode de détection de '*Candidatus Liberibacter africanus*' (Extraction Kit).

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

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

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

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

Tableau 14 : Synthèse des caractéristiques de performance de la méthode de détection de '*Candidatus Liberibacter americanus*' (Extraction Kit).

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

Annexe 1 - Recettes

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

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

Tableau 15 : Composition du tampon de broyage TRIS/EDTA/SDS.

Composants	Masse Molaire (g/mol)	Concentration finale	Masse (g)
Tris(hydroxyméthyl)aminométhane NH₂C(CH₂OH)₃ [TRIS Sigma 7-9, par exemple]	121,135	50 mmol/L	6,06
Acide Éthylène Diamine Tétraacétique C₁₀H₁₆N₂O₈ (EDTA)	292,243	5 mmol/L	1,46
Dodécylsulfate de sodium NaC₁₂H₂₅SO₄ (SDS)	288,379	1% (m/v)	10,00
Eau distillée stérile			Qsp 1 L

Étapes de fabrication :

- Peser les composants indépendamment et les mettre en solution dans une fraction d'eau distillée stérile, 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 stérile, en tenant compte de la masse de chaque composant ;
- Contrôler le pH et ajuster si nécessaire à 8,0 ;
- Autoclaver le tampon pour une conservation à l'état réfrigéré.

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

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

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

Solution NaOH 2% (m/V)

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

Tableau 16 : Composition de la solution d'extraction rapide NaOH 2% (m/V).

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

Étapes de fabrication :

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

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

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

Bibliographie

- Bové, J.M. (2006). Huanglongbing: a destructive, newly-emerging, century-old disease of citrus. *Journal of Plant Pathology* 88, 7-37.
- Gottwald, T.R. (2010). Current epidemiological understanding of citrus Huanglongbing. *Annual Review of Phytopathology* 48, 119-139.
- Li, W., Hartung, J.S., and Levy, L. (2006). Quantitative real-time PCR for detection and identification of *Candidatus Liberibacter* species associated with citrus huanglongbing. *Journal of Microbiological Methods* 66, 104-115.
- Li, W., Levy, L., and Hartung, J.S. (2009). Quantitative distribution of '*Candidatus Liberibacter asiaticus*' in citrus plants with citrus huanglongbing. *Phytopathology* 99, 139-144.
- Quintana-González de Chaves, M., Moran, F., Barbe, S., Bertolini, E., de la Rosa, F.S., and Marco-Noales, E. (2023). A new and accurate qPCR protocol to detect plant pathogenic bacteria of the genus '*Candidatus Liberibacter*' in plants and insects. *Scientific reports* 13, 3338.
- Tatineni, S., Sagaram, U.S., Gowda, S., Robertson, C.J., Dawson, W.O., Iwanami, T., et al. (2008). *In planta* distribution of '*Candidatus Liberibacter asiaticus*' as revealed by polymerase chain reaction (PCR) and real-time PCR. *Phytopathology* 98, 592-599.
- Teixeira, D.C., Luc Danet, J., Eveillard, S., Cristina Martins, E., de Jesus Junior, W.C., Takao Yamamoto, P., et al. (2005). Citrus huanglongbing in Sao Paulo State, Brazil: PCR detection of the '*Candidatus*' *Liberibacter* species associated with the disease. *Molecular and Cellular Probes* 19, 173-179.