

Détection de *Xanthomonas citri* pv. *citri* et *Xanthomonas citri* pv. *aurantifolii* sur plantes hôtes de la famille des Rutacées par PCR et par isolement, suivie d'une identification, par PCR, des souches isolées

Laboratoire de la santé des végétaux
Laboratoire national de référence « Bactéries sur bananier, agrumes et plantes tropicales »

Historique de la méthode

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

Une modification est considérée comme majeure dès lors qu'elle concerne des parties clés ou le fond même de la méthode, dont la prise en compte est susceptible d'améliorer significativement la portée ou le résultat de la méthode d'analyse. Une modification majeure induit en général des adaptations importantes. La méthode ainsi modifiée a fait l'objet d'une nouvelle validation.

Une modification est considérée comme mineure si elle apporte des précisions utiles ou pratiques, reformule les propos pour les rendre plus clairs ou plus précis, rectifie des erreurs bénignes. Les caractéristiques de performance de la méthode ainsi améliorée ne sont pas modifiées; elle n'a pas fait l'objet d'une nouvelle validation.

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

Tableau 1 : Historique des versions de la présente méthode.

Version	Nature des modifications	Date	Principales modifications
Version 1*	Sans objet	Septembre 2022	Version initiale
Version 2**	Mineure	Juin 2024	<ul style="list-style-type: none"> -Remplacement de la formulation « Ethanol 70% » par une formulation plus générique « Solution hydro-alcoolique de titre alcoolique au moins égal à 70% » (§5.5 et §8.1) -Volume donné de façon indicative pour la réalisation des isolements (§8.2 et §8.4.1) -Précisions apportées concernant les prises d'essai sur fruits (§8.1) -Correction de coquilles (§5.6.1 + orthographiques) -Précisions apportées quant à la nature possible du témoin positif de processus pour l'identification par PCR sur souches isolées (§5.6.3) -Précision apportée au §8.3.5 pour attirer l'attention sur le fait que le mélange réactionnel est différent pour la PCR temps réel Robène, selon le contexte d'utilisation, notamment possibilité de remplacer les amorces et sonde <i>citrus</i> par un volume équivalent d'eau ultra pure et diminution de la quantité d'ADN apportée dans le cadre de la PCR temps réel utilisée en test d'identification. -Repiquage rendu optionnel sous certaines conditions (§8.4.4) -Avertissement apporté sur l'interprétation des résultats PCR Mavrodieva (§9.2.1) et précision sur l'interprétation des résultats de PCR conventionnelle d'identification (§9.2.4) -Ajout de la figure 4 au §9.2.1 pour illustrer les résultats d'électrophorèse
Version 3***	Mineure	Novembre 2024	<ul style="list-style-type: none"> -Complément apportés au §1 dans la rubrique « objet », en lien avec l'introduction de 2 nouvelles références bibliographiques (EFSA, 2019 et Canteros, 2017) + mise à jour de la référence EPPO (2023) PM7/44 (2) -Avertissement apporté au schéma de détection (Figure 2) -Compléments apportés au §9.2.5 (notamment tableaux 24 et 25) et ajout du tableau 26 pour expliciter la formulation des résultats vis-à-vis de Xcc et Xca pour tous les cas de figure

* La version 1 de cette méthode a fait l'objet d'une consultation de juillet à août 2022, sur le site internet de l'agence, notamment auprès des laboratoires agréés français.

**La version 2 de cette méthode a fait l'objet d'une consultation du 17 au 31 mai 2024, 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 07 au 22 octobre 2024, sur le site internet de l'agence, notamment auprès des laboratoires agréés français.

Avant-propos

La méthode décrite dans ce document s'appuie sur le protocole de diagnostic de l'OEPP PM7/44(2) concernant la détection de *Xanthomonas citri* pv. *citri* et *Xanthomonas citri* pv. *aurantifolii*.

Elle s'appuie également sur le protocole de diagnostic de l'IPPC NIMP27 PD6 et, pour les méthodes de biologie moléculaire (PCR *in planta* et PCR sur souches isolées), sur des publications scientifiques (Robène *et al.*, 2020, Mavrodieva *et al.*, 2004).

La méthode a été caractérisée et validée par l'unité « Ravageurs et agents pathogènes tropicaux » du Laboratoire de la Santé des Végétaux (LSV-RAPT), Laboratoire National de Référence (LNR) pour la détection des bactéries sur agrumes.

Adresse : Anses - Laboratoire de la santé des végétaux – unité RAPT
3P, 7 chemin de l'IRAT, 97410 Saint-Pierre

Contact : saint-pierre.lsv@anses.fr

La méthode a fait l'objet d'une validation interne et d'une validation interlaboratoire selon les recommandations de l'OEPP (PM7/98 (4) (EPPO, 2019) et PM7/122 (1) (EPPO, 2014)). La validation interlaboratoire a pris la forme d'un essai interlaboratoire de validation (« test performance study » ou TPS) organisé dans le cadre du projet européen H2020 VALITEST¹ (<https://www.valitest.eu>).

Le CIRAD Réunion (UMR PVBMT) a étroitement collaboré aux travaux de méthodologie.

Les travaux méthodologiques effectués sur la méthode ont donné lieu à un rapport de caractérisation et de validation (Anses rapport Xcc 2022 version 1) et à un rapport de validation interlaboratoire (ANSES / VALITEST Test performance study Report: *Xanthomonas citri* pv. *citri*. Report XCC1-version 2).

Le travail de relecture a été effectué par l'Unité de coordination de la référence et par l'Unité Bactériologie, Virologie et OGM du Laboratoire de la Santé des Végétaux ainsi que par le CIRAD Réunion (UMR PVBMT).

¹ Ce projet a été financé par l'Union Européenne dans le cadre du programme de recherche et d'innovation Horizon 2020 au titre de la convention de subvention N° 773139.

Sommaire

Avant-propos.....	3
Introduction	5
Avertissements et précautions de sécurité	5
1 Objet et domaine d'application	6
2 Documents de référence	8
3 Termes, sigles et définitions	8
4 Principe de la méthode	8
5 Réactifs	11
5.1 Eau	11
5.2 Réactifs de biologie moléculaire.....	11
5.3 Tampons	12
5.4 Milieux de culture	13
5.5 Autres réactifs et consommables	13
5.6 Contrôles et témoins	14
6 Appareillage et matériels	16
6.1 Broyeur	16
6.2 Thermocycleur	17
6.3 Appareillage et matériels pour le test d'isolement	17
7 Échantillons.....	17
7.1 Conditions d'acceptation des échantillons	17
7.2 Conservation des échantillons avant analyse.....	17
7.3 Conservation des échantillons ou reliquats après analyse	18
8 Mode opératoire.....	19
8.1 Préparation des échantillons pour analyse	19
8.2 Broyage.....	19
8.3 Détection <i>in planta</i> par PCR	19
8.4 Détection <i>in planta</i> par isolement	23
8.5 Identification, par tests PCR, des souches isolées	25
9 Résultats.....	26
9.1 Contrôle de la validité des résultats	26
9.2 Calculs et expression des résultats	27
10 Caractéristiques de performance de la méthode	35
Annexe 1 – Recette des milieux utilisés pour la détection de <i>Xcc</i> et <i>Xca</i>	36
Bibliographie.....	38

Introduction

Le chancre bactérien des agrumes provoqué principalement par *Xanthomonas citri* pv. *citri* (*Xcc*) et plus secondairement par *Xanthomonas citri* pv. *aurantifolii* (*Xca*) est une maladie des agrumes dont l'incidence économique est importante pour les zones contaminées et qui constitue un risque majeur pour les zones indemnes.

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 nationale en vigueur.

Il est essentiel que les manipulations conduites conformément à la présente méthode soient exécutées 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 suspecté) et les isolements bactériens en résultant doivent être détruits par autoclavage ou autre moyen inactivant les bactéries.

Les consommables ayant été en contact avec le matériel végétal infecté (ou de statut suspect) et les isolements bactériens en résultant doivent être détruits par autoclavage ou autre moyen inactivant les bactéries.

Le matériel ayant été en contact avec le végétal infecté (ou de statut suspect) et/ou avec les isolements bactériens en résultant doit être désinfecté.

1 Objet et domaine d'application

Objet

La méthode concerne la détection et l'identification des souches de *Xanthomonas citri* responsables du chancre bactérien des agrumes. Ces souches se répartissent en 2 pathovars : *Xanthomonas citri* pv. *citri* et *Xanthomonas citri* pv. *aurantifolii* responsables, respectivement, du chancre asiatique des agrumes et du chancre sud-américain des agrumes. Si les symptômes provoqués sont identiques, seul *Xanthomonas citri* pv. *citri* est responsable des épidémies majeures, même dans les pays où les deux pathovars coexistent.

On notera qu'il y a également deux autres *taxa* du genre *Xanthomonas*, décrits comme pathogènes de plantes hôtes de la famille des Rutacées mais avec une symptomatologie clairement distincte : *X. euvesicatoria* pv. *citrumelonis* et *X. citri* pv. *bilvae*. Toutefois ces *taxa* sont responsables de maladies ponctuelles d'importance mineure pour l'agriculture (Baker *et al.*, 2014).

Xanthomonas citri pv. *citri* est le principal agent du chancre bactérien des agrumes. Au sein du pathovar *citri*, trois pathotypes ont été décrits avec des spectres d'hôtes différents (EPPO, 2023). **Le pathotype A** est celui qui a le plus grand impact économique. Il provoque des dégâts sur de nombreuses espèces de Rutacées –principalement *Citrus* spp., *Fortunella* spp. et *Poncirus* spp. – cultivées dans les conditions tropicales et subtropicales qui sont présentes dans de nombreux pays d'Asie, d'Amérique du Sud, d'Océanie et d'Afrique, ainsi qu'en Floride aux États-Unis. Des souches atypiques de *X. citri* pv. *citri* possédant un spectre limité de plantes hôtes ont été identifiées et ont été désignées sous les pathotypes A* et A^w (Sun *et al.*, 2004; Vernière *et al.*, 1998). **Le pathotype A*** infecte *Citrus aurantiifolia* (limettier mexicain) en conditions naturelles et est à l'origine d'épidémies en Asie, dans la péninsule arabique et en Afrique de l'Est (Vernière *et al.*, 1998, Pruvost *et al.* 2015). **Le pathotype A^w** qui a été rapporté, dans des conditions naturelles, aux États-Unis (Floride) (Cubero et Graham, 2002, 2004), en Inde et dans la péninsule arabique, possède également une gamme d'hôtes très restreinte : *Citrus aurantiifolia* et *Citrus macrophylla* (alemow). Il a été signalé que ces deux pathotypes provoquaient des lésions atypiques sur d'autres espèces d'agrumes dans des conditions expérimentales (Escalon *et al.*, 2013).

Xanthomonas citri pv. *aurantifolii* présente une gamme d'hôtes restreinte et une distribution géographique limitée. Au sein de ce pathovar, deux pathotypes ont été décrits avec des répartitions géographiques et des spectres d'hôtes différents :

Ainsi les souches de *Xanthomonas citri* pv. *aurantifolii* correspondant au **pathotype B** ont été décrites sur citron, lime mexicaine, orange amère et pamplemousse en Argentine, Paraguay et Uruguay (EPPO, 2023).

Les souches de *Xanthomonas citri* pv. *aurantifolii* correspondant au **pathotype C** ont été décrites sur lime mexicaine au Brésil (EPPO, 2023).

Si les deux pathovars partagent la même symptomatologie, leur virulence et leur dynamique épidémiologique sont très différentes. Ainsi dans les pays où il avait été initialement signalé (Argentine, Paraguay, Uruguay, Brésil), *Xanthomonas citri* pv. *aurantifolii* n'est plus détecté depuis de nombreuses années (EFSA, 2019), il a été complètement supplanté par *Xanthomonas citri* pv. *citri*, à tel point qu'il n'est plus considéré comme susceptible d'être présent dans les échantillons prélevés à l'import (EPPO, 2023). Cette supplantation pourrait s'expliquer par la production de substances de type bactériocines produites par les souches *Xanthomonas citri* pv. *citri* contre les souches *Xanthomonas citri* pv. *aurantifolii* (Canteros, 2017), rendant également invraisemblable la possibilité d'observer des cas de co-infections entre les deux pathovars (en cohérence avec les données de la littérature scientifique qui n'a jamais fait état de cas de co-infection).

Le tableau ci-après synthétise les informations relatives aux souches bactériennes associées à la maladie du chancre bactérien des agrumes.

Tableau 2 : Les différents types de chancres bactériens des agrumes et les souches bactériennes associées.

Chancre bactérien des agrumes (Citrus Bacterial Canker, CBC)					
Pathovars	<i>Xanthomonas citri</i> pv. <i>citri</i>			<i>X. citri</i> pv. <i>aurantifolii</i>	
Maladie	Chancre asiatique des agrumes Asiatic citrus bacterial canker (CBC-A)			Chancre sud-américain des agrumes South American citrus bacterial canker (CBC-B)	Chancre sud-américain des agrumes South American citrus bacterial canker (CBC-C)
Pathotypes	A	A*	A ^w	B	C
Distribution	Asie, Afrique, Amériques, Océanie	Asie et Afrique	Sous-continent Indien, péninsule Arabe, USA	Argentine, Paraguay, Uruguay	Brésil
Gamme d'hôtes	Large	Restreinte	Restreinte	Restreinte	Restreinte
Hôtes principaux	<i>Citrus</i> spp. et autres plantes hôtes de la famille des Rutacées	Lime mexicaine,	Lime mexicaine et alemow	Citron, Lime mexicaine, orange amère et pamplemousse	Lime mexicaine
Commentaires	Souches ayant le plus grand impact économique			Beaucoup moins agressif que le CBC-A	Beaucoup moins agressif que le CBC-A

Domaine d'application

La méthode s'applique sur végétal symptomatique : feuilles, fruits ou tiges de plantes hôtes de la famille des Rutacées, présentant des symptômes de chancre.

Les symptômes du chancre bactérien des agrumes se présentent sous formes de gales ou de lésions cratériformes sur l'écorce des fruits et sur les feuilles, les tiges et les pousses. Les symptômes peuvent apparaître en toutes saisons sur les jeunes plants et de la fin de l'été jusqu'à l'automne sur les jeunes arbres, car c'est la période durant laquelle ceux-ci produisent en abondance de nouvelles pousses anguleuses.

La gravité de l'infection dépend du degré de sensibilité des espèces et des cultivars de plantes hôtes (Goto, 1992).



Figure 1 : Différents types de symptômes provoqués par *Xanthomonas citri* pv. *citri* sur *Citrus* spp. (sur feuilles, tiges, fruit) (Source Internet Agriculture et Biodiversité Océan Indien)

2 Documents de référence

Tableau 3 : Liste des documents de référence (hors bibliographie).

	Référence	Titre
1	MOA 022	Méthode officielle d'analyse « 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	Rapport de caractérisation et de validation Xcc 2022	Rapport de caractérisation et de validation d'une méthode d'analyse : Détection de <i>Xanthomonas citri</i> pv. <i>citri</i> et <i>Xanthomonas citri</i> pv. <i>aurantifolii</i> sur plantes hôtes de la famille des Rutacées par PCR et par isolement, suivie d'une identification, par PCR, des souches isolées. Rapport Xcc 2022 - version (04/07/2022)
3	Rapport d'essai interlaboratoire de validation portant sur la détection de <i>Xanthomonas citri</i> pv. <i>citri</i>	ANSES / VALITEST Test performance study Report: <i>Xanthomonas citri</i> pv. <i>citri</i> . Report XCC1-version 2 (13/09/2021)

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...).

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

4 Principe de la méthode

La méthode développée dans le document s'appuie sur la combinaison de différents tests.

Contexte général:

Détection de *Xanthomonas citri* pv. *citri* et *Xanthomonas citri* pv. *aurantifolii* sur plantes hôtes de la famille des Rutacées par PCR et par isolement, suivie d'une identification par PCR des souches isolées

Les laboratoires doivent réaliser 3 tests de détection *in planta* suivis de 2 tests moléculaires d'identification sur souches bactériennes isolées:

- 1) Détection *in planta* par isolement– §8.4
- 2) Détection *in planta* par 2 tests moléculaires ciblant des parties différentes du génome :
 - (i) 1 test ciblant *X. citri* pv. *citri* et *X. citri* pv. *aurantifolii* (souches A/A*/A^w/B/C) : test de PCR conventionnelle adapté de Mavrodieva *et al.*, 2004 (§8.3.2)
 - (ii) 1 test ciblant *X. citri* pv. *citri* (souches A/A*/A^w) : test de PCR conventionnelle Robène *et al.*, 2020 (§8.3.3) ou test de PCR temps réel Robène *et al.*, 2020 (§8.3.5)

- 3) Identification, par 2 tests moléculaires, des souches isolées (§8.5.2). Ces 2 tests moléculaires d'identification doivent cibler des parties différentes du génome
- (i) 1 test ciblant *X. citri* pv. *citri* et *X. citri* pv. *aurantifolii* (souches A/A*/A^w/B/C) : test de PCR conventionnelle adapté de Mavrodieva *et al.*, 2004,
 - (ii) 1 test ciblant *X. citri* pv. *citri* (souches A/A*/A^w) : test de PCR conventionnelle Robène *et al.*, 2020 ou test de PCR temps réel Robène *et al.*, 2020.

On notera que 3 tests de détection basés sur des principes biologiques différents ou ciblant des régions différentes du génome doivent être réalisés. Si le test d'isolement est réalisé en premier et que l'identification de *X. citri* pv. *citri* ou *X. citri* pv. *aurantifolii* est réalisée avec succès, les tests moléculaires de détection ne sont pas nécessaires.

Toutefois, il est recommandé de réaliser les 3 tests de détection simultanément car si l'isolement est réalisé en premier et qu'il est négatif, le laboratoire ne pourra pas conclure sans avoir obtenu de résultats avec les tests moléculaires de détection.

Présentation des différents tests PCR :

Le test de PCR conventionnelle adapté de Mavrodieva *et al.*, 2004 sera désigné, par la suite, « **test de PCR conventionnelle Mavrodieva** » pour faciliter la lecture du document. Ce test de PCR conventionnelle utilise des amorces développées initialement par Mavrodieva *et al.*, 2004 pour un test de PCR temps réel en SYBR green. Le test de PCR temps réel a été adapté en PCR conventionnelle par Delcourt *et al.*, 2013. Il amplifie une séquence d'ADN située dans le gène de pathogénicité pthA, ce qui permet la détection de *X. citri* pv. *citri* et *X. citri* pv. *aurantifolii* (souches A/A*/A^w/B/C), sans distinction des 2 pathovars.

Le test de PCR conventionnelle Robène *et al.*, 2020 sera désigné, par la suite, « **test de PCR conventionnelle Robène** » pour faciliter la lecture du document. Ce test de PCR conventionnelle amplifie une séquence d'ADN située dans le gène XAC1051 qui code pour une protéine transmembranaire hypothétique. Ce test PCR permet la détection et l'identification uniquement de *X. citri* pv. *citri* (pathotypes A, A*, A^w) sans distinction des pathotypes.

Le test de PCR temps réel Robène *et al.*, 2020 sera désigné, par la suite, « **test de PCR temps réel Robène** » pour faciliter la lecture du document. Tout comme le test de PCR conventionnelle Robène, le test de PCR temps réel Robène amplifie une séquence d'ADN située dans le gène XAC1051 qui code pour une protéine transmembranaire hypothétique. Ce test PCR permet la détection et l'identification uniquement de *X. citri* pv. *citri* (pathotypes A, A*, A^w) sans distinction des pathotypes. La PCR temps réel Robène est une PCR duplexe qui intègre également un **contrôle interne** qui correspond à une séquence d'ADN endogène de la plante qui est donc présente dans l'échantillon (5.8S rDNA) lorsque le test est réalisé en détection *in planta*. Ce contrôle interne est co-extrait et co-amplifié avec l'ADN cible lors du process global.

Le test de PCR conventionnelle Robène et le test de PCR temps réel Robène présentent des résultats de performance équivalents et peuvent être **utilisés indépendamment** par les laboratoires en détection et/ou en identification. **Pour la parfaite information du client, le rapport d'analyse devra toutefois préciser la technique de biologie moléculaire qui a été utilisée pour l'analyse à la fois en détection le cas échéant et en identification le cas échéant (voir §9.2.6).**

Schéma de détection :

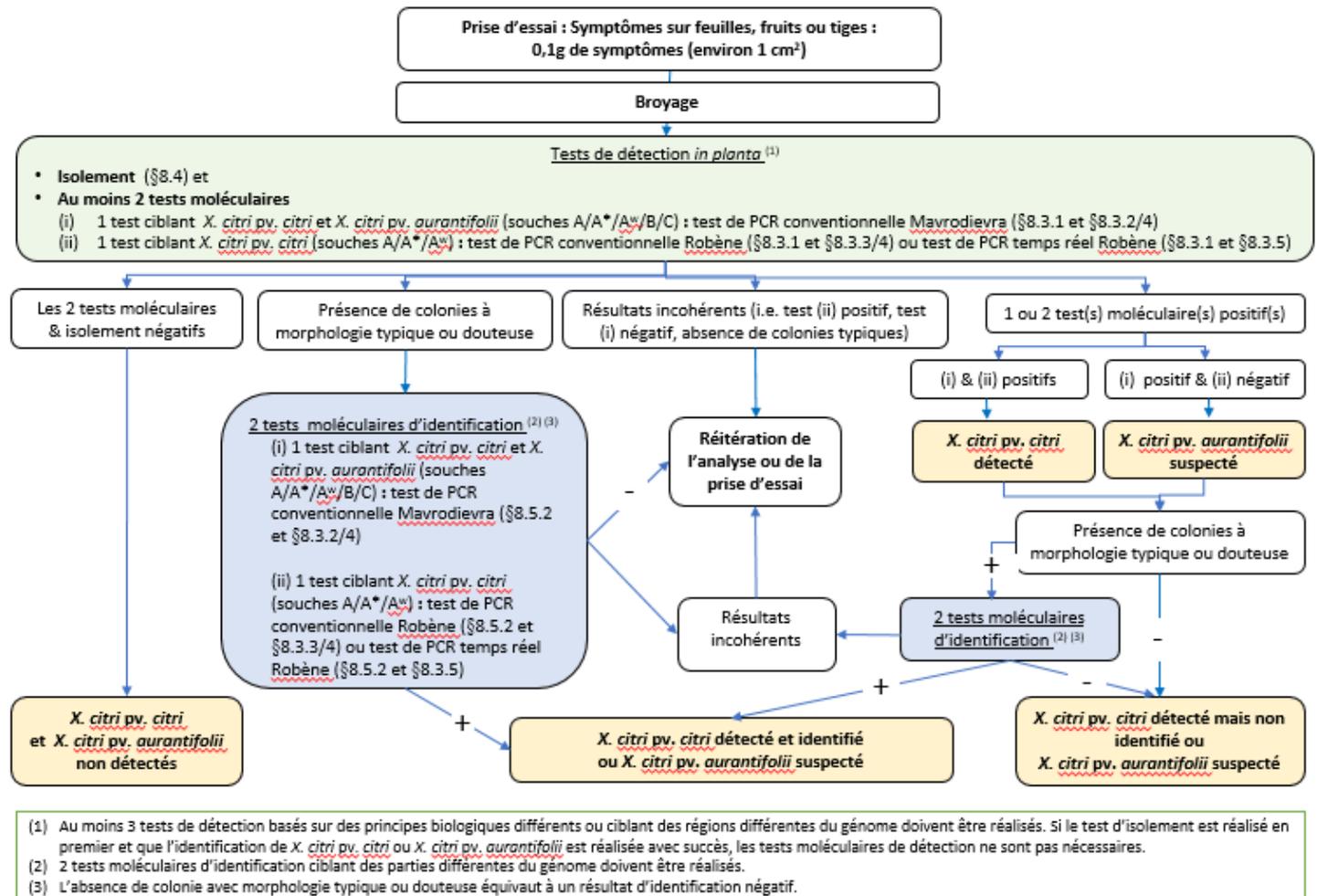


Figure 2 : Schéma de détection et d'identification de *Xanthomonas citri* pv. *citri* et *Xanthomonas citri* pv. *aurantifolii* sur plantes hôtes de la famille des Rutacées par PCR, adapté du protocole de diagnostic OEPP PM7/44 (2).
 Avertissement : Par souci de lisibilité le schéma de détection ne présente pas toutes les combinaisons de résultats possibles. Ces dernières sont explicitées au §9.2.5.

Tous les tests intégrés dans la méthode sont qualitatifs, c'est à dire qu'ils donnent un résultat du type « positif » (c'est-à-dire « détecté » ou « suspecté » ou « identifié ») ou « négatif » (= « non détecté » ou « non identifié »).

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.

5 Réactifs

Avertissement : Des appellations commerciales ou fournisseurs peuvent être mentionnés dans le descriptif des produits 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 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 contaminations ou de tout autre élément pouvant interférer sur le résultat (pour les tests de biologie moléculaire notamment : absence de nucléases, inhibiteurs de PCR, etc.). 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 juge satisfaisantes.

5.1 Eau

D'une manière générale l'eau utilisée pour la préparation des tampons/milieux de culture ainsi que pour les étapes de préparation des échantillons (préparation des suspensions bactériennes) doit être de qualité « analytique » garantissant d'atteindre les critères de performance attendus pour les tests.

L'eau utilisée pour les étapes de PCR (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'extraction et d'amplification (kit d'extraction d'ADN, mastermix ou core kit commercial de polymérase thermostable, dNTP, amorces, sondes, eau de qualité de biologie moléculaire).

5.2.1 Kit d'extraction d'ADN

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

5.2.2 Master mix

Les tests de PCR conventionnelles ont été caractérisés et validés avec le mélange réactionnel du kit GoTaq® G2 Hot Start Polymerase (Promega). Les validations ont été réalisées avec le tampon de master mix contenant le tampon de charge.

Le test de PCR temps réel Robène a été caractérisé et validé avec le mélange réactionnel du kit GoTaq® Probe qPCR Master Mix (Promega) 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.

5.2.3 Oligonucléotides

Séquences des amorces pour les PCR conventionnelles

Tableau 4 : Séquences des amorces de la PCR conventionnelle Mavrodieva.

Amorces	Sequence (5'-3')	Taille du fragment généré
VM3	GCA TTT GAT GAC GCC ATG AC	151 pb
VM4	TCC CTG ATG CCT GGA GGA TA	

Tableau 5 : Séquences des amorces de la PCR conventionnelle Robène.

Amorces	Sequence (5'-3')	Taille du fragment généré
XAC1051-F	AAA TTC TTG TCG ATC TGC TGG CT	499 pb
XAC1051-R	GCC GCC GCA TAA TTC TTC TCA C	

Séquences des amorces et sonde pour la PCR temps réel

Tableau 6 : Séquences des amorces et sondes de la PCR temps réel Robène.

Amorces	Sequence (5'-3')	Taille du fragment généré
qPCR-XAC1051-F	AGA GGC GCA CTA TGG CTT TC	58 pb
qPCR-XAC1051-R	CAA CCC AGG ACC TGC AAG AA	
citrus5.8S-F	GCG AAA TGC GAT ACT TGG TGT GA	94 pb
citrus5.8S-R	CGT GCC CTC GGC CTA ATG	
Sondes	Sequence (5'-3')	
P-XAC1051	FAM - CGG TGA GAA GCT GTA C – MGB	
P-citrus5.8S	VIC - ATC CCG TGA ACC ATC G - MGB	

Pour la PCR temps réel, les différentes amorces et sondes sont commandées avec *a minima* une méthode de purification HPLC (High Performancy Liquid Chromatography).

5.3 Tampons

5.3.1 Composition et préparation

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

- Tampons d'extraction d'ADN (par exemple : ceux du DNeasy® Plant mini kit de Qiagen)
- Tampon de migration (par exemple : TAE ou TBE)
- Tampon de charge (si celui-ci n'est pas intégré au tampon du master mix cf. §5.2.2)

5.3.2 Conservation

Les préparations des tampons 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.

5.4 Milieux de culture

Milieu de culture non-sélectif LPGA : recette disponible en annexe 1.

Milieu de culture semi-sélectif LPGA-KC (Pruvost *et al.*, 2005) : recette disponible en annexe 1.

Milieu de culture non-sélectif SPA modifié (Canteros *et al.*, 1985) davantage adapté pour l'isolement des souches *Xca* : recette disponible en annexe 1.

5.4.1 Contrôle

Les milieux de culture sont des réactifs critiques pour la réalisation des isollements. En conséquence, chaque lot de fabrication d'un milieu (commercial ou fabriqué au sein du laboratoire), doit être contrôlé avant ou simultanément à sa première utilisation. Ces contrôles portent sur la qualité physique et microbiologique. Concernant le contrôle de qualité microbiologique, il sera vérifié *a minima* la bonne croissance de la souche cible et l'absence de contaminants.

5.4.2 Conservation

Les milieux de culture commerciaux doivent être stockés et conservés selon les recommandations du fournisseur.

En l'absence de préconisations, ou dans le cas de milieux fabriqués au sein du laboratoire, ceux-ci doivent être utilisés dans un délai de trois mois après fabrication. En cas de non utilisation dans les trois mois, un nouveau contrôle de conformité du milieu peut être réalisé permettant de prolonger son utilisation d'un mois. Le stockage des milieux doit être réalisé, à une température $\leq 20^{\circ}\text{C}$, de préférence à l'abri de la lumière.

Quelle que soit l'origine du milieu (commerciale ou interne au laboratoire), en cas de changement de couleur, de signe d'évaporation/déshydratation ou de prolifération microbienne, il convient d'éliminer les milieux concernés.

Remarque : dans le cas des milieux contenant des antibiotiques, il est préférable de les utiliser peu de temps après leur fabrication pour avoir une efficacité d'action optimale. Ils ne devront pas être utilisés au-delà de deux mois après leur fabrication (sauf indications contraires du fournisseur). Ils devront alors être conservés à une température réfrigérée $\leq 20^{\circ}\text{C}$, à l'abri de la lumière. Au moment de l'utilisation des milieux, il sera alors nécessaire d'attendre qu'ils soient revenus à température ambiante.

5.5 Autres réactifs et consommables

► Consommables à usage unique :

- Microcônes stériles avec et sans filtre de volume adapté
- Microtubes stériles de volume adapté
- Microtubes, barrettes ou plaques stériles pour PCR de volume adapté au thermocycleur utilisé

► Anses d'inoculation stériles.

► **Solution hydro-alcoolique de titre alcoolique au moins égal à 70%** : désinfection superficielle sur le végétal.

► **Solution hydro-alcoolique à 70% ou plus** (et éventuellement un produit détergent désinfectant de type Aniospray) : désinfection des surfaces de travail et du matériel lors des étapes de prise d'essai, de broyage et d'isolement.

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

5.6 Contrôles et témoins

L'utilisation de témoins de manipulation est obligatoire pour la mise en œuvre de chaque test décrit dans la méthode. L'utilisation de ces témoins sert à valider le bon déroulement des différentes étapes de l'analyse. La nature des témoins à utiliser dans chaque test est décrite dans les paragraphes ci-après.

5.6.1 Pour la détection *in planta* par PCR

Conformément aux exigences de la méthode d'analyse MOA 022, les témoins à intégrer dans le test de PCR pour la détection *in planta* sont les suivants :

- un **témoin négatif de processus** (TS ou T-) : matrice ne contenant pas l'organisme cible, traitée dans les mêmes conditions que les échantillons à analyser, déclarée non contaminée à l'issue de la manipulation (feuilles, fruits ou tiges de plantes hôtes de la famille des Rutacées non infectés).

Remarque: il est possible d'utiliser des feuilles, fruits ou tiges de plantes hôtes de la famille des Rutacées non infectées congelées comme témoins négatifs de processus.

- un **témoin positif de processus** (T+) : matrice contenant l'organisme cible, traitée dans les mêmes conditions que les échantillons à analyser, déclarée contaminée à l'issue de la manipulation (feuilles, fruits ou tiges de plantes hôtes de la famille des Rutacées infectés). Il donne au minimum l'assurance d'un déroulement correct de la manipulation. Pour chaque série d'analyses, on peut soit utiliser un échantillon de référence naturellement contaminé par Xcc ou un échantillon artificiellement contaminé par dopage avec une souche Xcc de référence.

Le témoin positif de processus peut contenir la bactérie cible sous une forme inactivée, à la condition qu'il puisse donner l'assurance que les étapes d'extraction d'acides nucléiques et d'amplification aient été réalisées avec succès.

Remarque: il est possible d'utiliser des feuilles, fruits ou tiges de plantes hôtes de la famille des Rutacées infectées congelées comme témoins positifs de processus.

En complément du témoin positif de processus à concentration bactérienne élevée, il est conseillé, dans la mesure du possible, d'utiliser un **témoin positif de PCR** en limite de détection (il s'agit d'un témoin de PCR contenant la séquence d'ADN cible en quantité proche du seuil de détection).

Ce témoin permettra au sein du laboratoire de détecter des anomalies de déroulement du test, susceptibles d'entraîner la non-détection d'échantillons faiblement infectés.

Ce témoin est choisi par le laboratoire parmi les échantillons ayant fourni, lors d'études préalables, des résultats suffisamment constants. Il peut s'agir de témoins positifs produits en interne (suspension bactérienne de référence à une concentration déterminée, solution d'ADN cible à une concentration déterminée) ou de témoins commerciaux utilisés à une dilution appropriée, lorsqu'ils existent et sont disponibles,

- un **témoin négatif de PCR** (A- ou Teau) : il contient tous les éléments du mélange réactionnel mais aucun extrait d'ADN n'est ajouté, il est remplacé par de l'eau ; cela permet de vérifier l'absence de contamination au cours de la réaction de PCR.

Remarque : Dans la présente méthode, la souche utilisée comme souche Xcc de référence est la souche pathotype issue de collection internationale (souche CFBP2525 : elle a été isolée sur citron en Nouvelle-Zélande en 1957).

D'autres souches Xcc issues de collections internationales ou isolées par le laboratoire, préalablement vérifiées sur milieux et en test moléculaire peuvent également être utilisées comme souches témoins de référence.

La manipulation de ces souches témoins positifs doit s'effectuer de manière séparée dans l'espace et/ou dans le temps de façon à éviter toute contamination accidentelle des échantillons.

À noter que des souches Xca de référence peuvent aussi être utilisée en complément d'une souche Xcc de référence, mais pas en substitution car elles ne donneront pas de résultats positifs avec les tests moléculaires Robène.

Les témoins de processus doivent faire l'objet de deux puits PCR. Les témoins de PCR peuvent faire l'objet d'un puits unique.

D'autres contrôles peuvent être ajoutés si nécessaire et sont définis par la méthode MOA 022.

***Remarque** : Les travaux méthodologiques n'ayant pas révélé de problème particulier d'inhibition liée à la matrice Citrus spp. et autres plantes hôtes de la famille des Rutacées, l'utilisation d'un témoin d'inhibition n'est pas exigée. Toutefois en cas de suspicion d'inhibition (résultat de PCR négatif et isolement positif), l'analyse de PCR peut être répétée en incluant un témoin d'inhibition pour tester l'hypothèse d'inhibition. Selon les résultats obtenus, l'utilisation de ce témoin pourra être généralisée au sein du laboratoire.*

On notera que la PCR temps réel Robène comprend un contrôle interne qui fait office de témoin d'inhibition. En cas de suspicion d'inhibition ce test peut donc être privilégié à celui de la PCR conventionnelle Robène, pour confirmer ou infirmer une suspicion d'inhibition.

5.6.2 Pour la détection *in planta* par isolement

Pour la détection *in planta* par isolement, il est nécessaire de prévoir *a minima* un témoin négatif de processus. Le témoin négatif de processus utilisé pour les tests PCR (cf. §5.6.1) peut être utilisé comme témoin négatif de processus pour la détection par isolement. Si un témoin négatif de processus différent est utilisé, il devra répondre aux mêmes exigences que celles décrites pour le témoin négatif de processus utilisé en PCR (cf. §5.6.1).

5.6.3 Pour l'identification par PCR des souches isolées

Conformément aux exigences de la méthode d'analyse MOA 022, les témoins à intégrer dans le test de PCR pour l'identification des souches isolées sont les suivants :

- un **témoin négatif de processus** (T- ou TS) : suspension ne contenant pas l'organisme cible (donc constituée uniquement de l'eau de qualité analytique stérilisée), traitée dans les mêmes conditions que les suspensions bactériennes à analyser, déclarée non contaminée à l'issue de la manipulation.
- un **témoin positif de processus** (T+) : il s'agit d'un témoin de PCR contenant la séquence cible, traitée dans des conditions similaires aux suspensions bactériennes à analyser, déclaré contaminé à l'issue de la manipulation. Ce témoin donne au minimum l'assurance d'un déroulement correct de la PCR d'identification.

***Remarque** : il est possible d'utiliser une suspension bactérienne réalisée à partir d'une souche Xcc de référence (cf. §5.6.1) préparée à l'avance et/ou inactivée. Il est également possible d'utiliser des extraits d'ADN positifs par exemple résultant de l'extraction du témoin positif de processus utilisé pour la détection *in planta* par PCR.*

- un **témoin négatif de PCR** (A- ou Teau) : il contient tous les éléments du mélange réactionnel mais aucun extrait d'ADN n'est ajouté, uniquement de l'eau ; cela permet de vérifier l'absence de contamination au cours de la réaction de PCR.

Prévoir un seul puits par témoin.

D'autres contrôles peuvent être ajoutés si nécessaire et sont définis par la méthode MOA 022.

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, et notamment des tests de biologie moléculaire, le laboratoire disposera des appareils décrits dans la méthode d'analyse MOA 022.

Les considérations métrologiques sont celles de la MOA022 ou de la norme ISO8655 (version 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).

Tableau 7 : EMT par grandeur.

Grandeur	EMT
Volume	Se référer à la norme ISO8655 ou utiliser les EMT suivantes : volume < à 10mL : EMT = ± 10% volume ≥ à 10mL : 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 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

La méthode a été validée en utilisant, pour la matrice végétale de type feuille, fruit ou tige, un broyeur à roulement à billes (type Homex 6 de Bioreba), le broyage de l'échantillon se faisant dans un sachet de broyage en plastique, muni d'une gaze de filtration à mailles en nylon. Le broyat peut alors être récupéré directement dans le sachet. Toutefois, tout autre procédé de broyage permettant d'obtenir des résultats équivalents peut également être utilisé.

6.2 Thermocycleur

Les tests de PCR conventionnelles ont été évalués et validés sur thermocycleur Veriti™ Thermal Cycler (ThermoFisher Scientific). D'autres thermocycleurs permettant d'obtenir des résultats équivalents peuvent être utilisés.

Le test de PCR temps réel a été évalué et validé sur thermocycleur QuantStudio 5 Real-Time PCR System (ThermoFisher Scientific). Des résultats équivalents ont été obtenus sur StepOnePlus (ThermoFisher Scientific), Light Cycler LC 480 (Roche Life Science). D'autres thermocycleurs permettant également d'obtenir des résultats équivalents peuvent être utilisés.

6.3 Appareillage et matériels pour le test d'isolement

Pour la mise en œuvre du test d'isolement bactérien, le laboratoire devra également disposer des appareils suivants :

- Incubateur bactériologique assurant une température de +28°C ;
- Enceinte réfrigérée à +5°C ;
- Incubateur ≤ 20°C ;
- PSM ou hotte stérile permettant d'assurer des conditions axéniques ;
- Congélateur : ≤ -18°C ;
- Autoclave.

7 Échantillons

7.1 Conditions d'acceptation des échantillons

Le laboratoire réalise l'analyse sur environ 0,1g de matériel végétal frais. En dessous de 0,1g de matériel végétal, des réserves sont émises quant au résultat d'analyse si ce dernier est négatif.

Le matériel végétal doit arriver au laboratoire dans un état de fraîcheur approprié (feuilles turgescents, fruits et tiges frais, turgescents et non fanés).

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.

7.2 Conservation des échantillons avant analyse

Le délai entre la réception de l'échantillon et le début de l'analyse doit être de préférence inférieur à 3 jours et ne doit pas dépasser 7 jours pour les échantillons frais prélevés dans de bonnes conditions. L'échantillon devra pendant ce temps être conservé en enceinte réfrigérée à +5°C.

7.3 Conservation des échantillons ou reliquats 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 8 : Type de reliquats d'échantillons à conserver et conditions de leur conservation pour les besoins d'analyses contradictoires et /ou de confirmation.

Etapas	Type de reliquat	Conservation		Modalités d'envoi à un autre laboratoire le cas échéant
		Conditions	Durée	
Prise d'essai	Feuilles/fruits/tiges de plantes hôtes de la famille des Rutacées	+5°C	Tout résultat : 15 jours après envoi du rapport	Sachets individuels fermés et clairement identifiés Température ambiante Transporteur express avec suivi
Broyage	Broyat végétal	+5°C	Tout résultat : 15 jours après envoi du rapport	Tubes / pots hermétiques clairement identifiés Température ambiante Transporteur express avec suivi
Extraction d'ADN	Extraits d'ADN	≤-18°C	Résultat négatif : 15 jours après envoi du rapport Résultat autre que négatif : 12 mois	Tubes hermétiques clairement identifiés Température ambiante Transporteur express avec suivi
Isolements bactériens	Boîtes d'isolement/souches isolées	+5°C	Tout résultat : 15 jours après envoi du rapport	Boîtes de culture parafilmmées en conditionnement hermétiques et clairement identifiées Température ambiante Transporteur express avec suivi
Identification PCR	Souches bactériennes identifiées positivement mises en collection	Selon les modalités de mise en collection (exemple : température ambiante pour les lyophilisats ; température ≤-18°C pour les cryobilles ou les suspensions bactériennes)	Résultat positif : 12 mois	Conditionnements hermétiques clairement identifiés Température ambiante Transporteur express avec suivi

8 Mode opératoire

L'ensemble des opérations décrites ci-après doit s'effectuer en portant des gants à usage unique.

8.1 Préparation des échantillons pour analyse

La prise d'analyse se réalise sur échantillons symptomatiques et est constituée d'environ 0,1g de matériel végétal frais.

Après une décontamination rapide de surface à l'aide de papier absorbant imbibé de solution hydro-alcoolique de titre alcoolique au moins égal à 70%, prélever au scalpel environ 1cm² autour du ou des symptômes (1 à 3 symptômes en général) et les placer dans un sachet de broyage.

Lorsque la prise d'essai a lieu sur fruit, il faut veiller à prélever les symptômes de façon superficielle, c'est-à-dire en restant au niveau de l'épiderme (enveloppe extérieure du fruit).

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

8.2 Broyage

Broyer le matériel végétal dans de l'eau de qualité analytique stérilisée selon le ratio poids/volume de 1/50 soit 5mL d'eau pour 0,1g de matériel végétal.

À partir du broyat végétal obtenu:

- des isolements sur boîtes de culture sont réalisés selon les indications du §8.4.
- 2mL (approximativement) du broyat végétal obtenu sont transférés dans des tubes de type Eppendorf® pour la réalisation de l'extraction d'ADN telle que décrite au §8.3.1.

Remarque : L'embout porte-cône de la pipette doit être décontaminé entre chaque échantillon si celui-ci se trouve en contact avec le sachet de broyage. L'utilisation de cônes à pointe large peut faciliter le prélèvement du broyat le cas échéant. Enfin, pour des raisons pratiques, le volume nécessaire pour réaliser les isolements (1 x 30 à 50µL ou 2 x 30 à 50µL selon le cas) peut être prélevé à partir des 2mL prélevés pour l'extraction PCR.

Les tubes sont centrifugés environ 10 minutes à 20 000g afin de culoter les bactéries de préférence en conditions réfrigérées (meilleure tenue du culot). Eliminer le surnageant.

Ce culot peut être directement extrait, ou bien être conservé à +5°C pendant quelques heures avant extraction, ou encore être conservé à une température inférieure ou égale à -18°C pendant plusieurs semaines en attente de l'extraction.

Les reliquats de broyats sont conservés selon les modalités indiquées dans le tableau 8.

8.3 Détection *in planta* par PCR

Chaque échantillon fait l'objet d'une extraction unique, mais chaque extrait doit être déposé deux fois soit au final 2 puits par échantillon (analyse de détection).

8.3.1 Extraction d'ADN

L'ADN total de l'échantillon contenant l'ADN bactérien est extrait et purifié à l'aide d'un kit commercial (cf. §5.2.1). L'éluion 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 8.

8.3.2 PCR conventionnelle Mavrodieva: mélange réactionnel et amplification

Ce paragraphe concerne la PCR conventionnelle Mavrodieva de détection *in planta* et d'identification sur souches bactériennes isolées.

Mélange réactionnel

Tableau 9 : Mélange réactionnel de la PCR conventionnelle Mavrodieva utilisée en test de détection (*in planta*) ou en test d'identification sur souches isolées.

Réactifs	[Solution-mère] (exemple)	[Puits]	Volume pour un puits (µl) (pour les concentrations de solutions-mères données)
Eau ultra pure			14,3
Tampon	5 X	1 X	5
MgCl ₂	25 mM	1,0 mM	1
dNTP	10 mM	0,2 mM	0,5
Amorce VM3	5 µM	0,2 µM	1
Amorce VM4	5 µM	0,2 µM	1
Taq Polymerase	5U/µl	1 U	0,2
Total avant ajout ADN			23
ADN			2
Total avec ADN			25

Remarque :

-Le volume final est de 25µl dans chaque puits soit 23µl de mélange réactionnel et 2µl d'ADN (ou d'eau pour le témoin A-).

Programme d'amplification

Tableau 10 : Programme d'amplification de la PCR conventionnelle Mavrodieva.

Température (°C)	Durée	Cycles
Dénaturation initiale	95	5 minutes
Dénaturation	95	45 secondes
Hybridation	58	45 secondes
Elongation	72	45 secondes
Elongation finale	72	10 minutes
Conservation	12	∞

La taille des ampliâts générés est de 151 pb.

8.3.3 PCR conventionnelle Robène: mélange réactionnel et amplification

Ce paragraphe concerne la PCR conventionnelle Robène de détection *in planta* et d'identification sur souches bactériennes isolées.

Mélange réactionnel

Tableau 11 : Mélange réactionnel de la PCR conventionnelle Robène utilisée en test de détection (*in planta*) ou en test d'identification sur souches isolées.

Réactifs	[Solution-mère] (exemple)	[Puits]	Volume pour un puits (µl) (pour les concentrations de solutions-mères données)
Eau ultra pure			10,25
Tampon	5 X	1 X	5
MgCl ₂	25 mM	2 mM	2
dNTP	10 mM	0,2 mM	0,5
Amorce XAC1051-F	5 µM	0,5 µM	2,5
Amorce XAC1051-R	5 µM	0,5 µM	2,5
Taq Polymerase	5U/µl	1,25U	0,25
Total avant ajout ADN			23
ADN			2
Total avec ADN			25

Remarque :

-Le volume final est de 25µl dans chaque puits soit 23µl de mélange réactionnel et 2µl d'ADN (ou d'eau pour le témoin A-).

Programme d'amplification

Tableau 12 : Programme d'amplification de la PCR conventionnelle Robène.

	Température (°C)	Durée	Cycles
Dénaturation initiale	95	2 minutes	
Dénaturation	95	45 secondes	35
Hybridation	65	45 secondes	
Elongation	72	1 minute	
Elongation finale	72	5 minutes	
Conservation	12	∞	

La taille des ampliâts générés est de 499 pb.

8.3.4 Électrophorèse et révélation pour les PCR conventionnelles

Déposer environ 10µL de l'amplifiât, soit directement soit mélangés à du tampon de charge (environ 2µL pour 10µL d'amplifiât) selon le type de tampon du master mix utilisé précédemment (cf. §5.3.1), sur un gel d'agarose à 2% (valeurs indicatives).

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

Effectuer l'électrophorèse dans du tampon de migration à une concentration identique à celle du tampon utilisé pour réaliser le gel (à titre indicatif, la migration peut se faire avec les paramètres suivants : 100 volts durant 1 heure).

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

D'autres marqueurs d'ADN équivalents peuvent également être utilisés pour la préparation du bain de coloration.

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

8.3.5 PCR temps réel Robène

Mélange réactionnel

On notera que le mélange réactionnel est différent selon que la PCR temps réel Robène est utilisé en test de détection (*in planta*) ou en test d'identification (sur souches isolées).

Tableau 13 : Mélange réactionnel de la PCR temps réel Robène utilisé en test de détection (*in planta*).

Réactifs	[Solution-mère] (exemple)	[Puits]	Volume pour un puits (µl) (pour les concentrations de solutions-mères données)
Eau ultra pure			0,9125
Amorce qPCR-XAC1051-F	24 µM	0.60 µM	0,375
Amorce qPCR-XAC1051-R	24 µM	0.60 µM	0,375
Sonde TaqMan P-XAC1051 (FAM)	10 µM	0.425 µM	0,6375
Amorce citrus5.8S-F	12 µM	0.05 µM	0,0625
Amorce citrus5.8S-R	12 µM	0.05 µM	0,0625
Sonde Taqman P-citrus5.8S (VIC)	10 µM	0.05 µM	0,075
GoTaq® Probe qPCR Master Mix (Promega) avec CXR	2X	1X	7,5
Total avant ajout ADN			10
ADN			5
Total avec ADN			15

Remarque : Le volume final est de 15µl dans chaque puits soit 10µl de mélange réactionnel et 5µl d'ADN pour la détection in planta. Les 5µL d'ADN seront remplacés par 5µL d'eau pour le témoin A-.

Tableau 14 : Mélange réactionnel de la PCR temps réel Robène utilisé en test d'identification sur souches isolées.

Réactifs	[Solution-mère] (exemple)	[Puits]	Volume pour un puits (µl) (pour les concentrations de solutions-mères données)
Eau ultra pure			3,9125
Amorce qPCR-XAC1051-F	24 µM	0.60 µM	0,375
Amorce qPCR-XAC1051-R	24 µM	0.60 µM	0,375
Sonde Taqman P-XAC1051 (FAM)	10 µM	0.425 µM	0,6375
Amorce citrus5.8S-F*	12 µM	0.05 µM	0,0625*
Amorce citrus5.8S-R*	12 µM	0.05 µM	0,0625*
Sonde Taqman P-citrus5.8S (VIC)*	10 µM	0.05 µM	0,075*
GoTaq® Probe qPCR Master Mix (Promega) avec CXR	2X	1X	7,5
Total avant ajout ADN			13
ADN			2
Total avec ADN			15

Remarque :

-Il est possible de remplacer les amorces et la sonde citrus (*) par un volume équivalent d'eau ultra pure dans le mélange réactionnel puisque la PCR d'identification se réalise sur suspensions bactériennes (absence de matrice végétale).

-Le volume final est de 15µl dans chaque puits soit 13µl de mélange réactionnel et 2µl de suspension bactérienne pure pour l'identification sur souches isolées. Les 2µL de suspension bactérienne seront remplacés par 2µL d'eau pour le témoin A-.

Programme d'amplification, valable pour la détection et l'identification**Tableau 15** : Programme d'amplification de la PCR temps réel Robène.

Température (°C)	Durée	Cycles
Dénaturation initiale	95	2 minutes
Dénaturation	95	15 secondes
Hybridation/ Elongation*	60	1 minute
		45

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

8.4 Détection *in planta* par isolement**8.4.1 Isolement**

L'isolement se fait à partir du broyat pur *a minima* sur une boîte de milieu non sélectif LPGA, et si disponible, en plus sur une boîte de milieu semi-sélectif LPGA-KC. Il peut se faire aussi en plus sur milieu SPA modifié, plus spécifiquement adapté pour l'isolement des souches *Xca* (notamment du pathotype B).

En conditions axéniques, prélever et déposer, par boîte de culture, 30 à 50µL (volume indicatif) du broyat végétal obtenu selon les indications du §8.2.

Réaliser un étalement par épuisement en 3 secteurs (isolement 3 secteurs) à l'aide d'une anse d'inoculation stérile.

8.4.2 Incubation

Incuber les boîtes de culture LPGAensemencées à +28 °C pendant au moins 48h et les boîtes de culture LPGA-KC à +28 °C pendant au moins 72h.

8.4.3 Lecture

Observer les boîtes après le temps de croissance indiqué au §8.4.2.

8.4.4 Repiquage pour identification

Tout échantillon présentant au moins une colonie typique de *Xcc* ou *Xca* (ou douteuse) sur au moins une boîte de culture (quel que soit le milieu) doit faire l'objet d'identification par 2 tests PCR ciblant des régions différentes du génome.

Les colonies typiques de *Xcc* et *Xca* ont les caractères décrits ci-après :

- ▶ **sur LPGA** : les colonies apparaissent en général après 48h. Elles sont petites, claires, jaunâtres. Le caractère jaune, muqueux et bombé de la colonie n'apparaît qu'au bout de quelques jours (cf. la photo ci-dessous).

Les souches *Xca* sont un peu plus longues à pousser que les souches *Xcc* (environ un jour de plus).

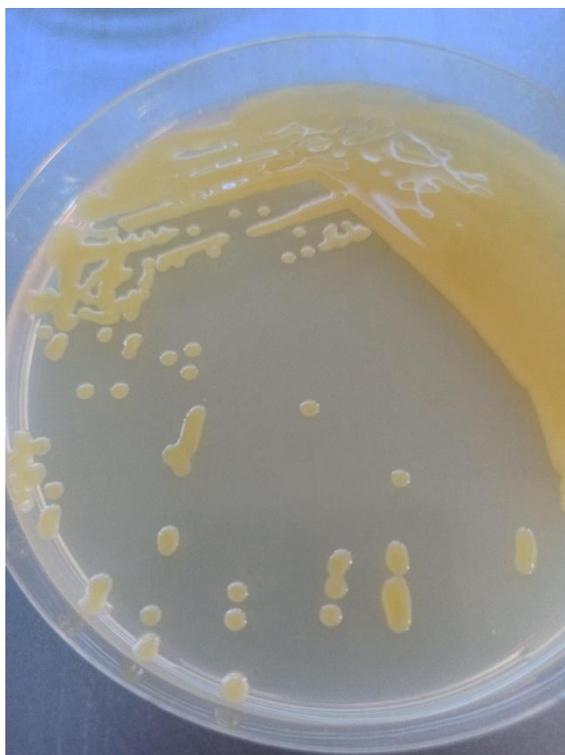


Figure 3 : Colonies de *Xanthomonas citri* pv. *citri* souche CFBP2525 sur milieu LGPA après 72h de croissance à +28°C (source Anses LSV).

- ▶ **sur LPGA-KC** : la croissance est un peu plus lente : les colonies apparaissent en général après 72h. Les colonies présentent également un aspect jaune muqueux et bombé.
- ▶ **sur SPA modifié** : ce milieu a été décrit comme permettant une meilleure croissance de *Xca* que sur les milieux à base de glucose (ex. LPGA). La morphologie des colonies est similaire à celle décrite sur LPGA mais la croissance reste plus lente que pour *Xcc*, notamment pour les souches de pathotype B.

L'identification des colonies typiques de *Xcc* ou *Xca* (ou douteuses) se fait à l'aide des tests PCR d'identification : test de PCR conventionnelle Mavrodieva et test de PCR conventionnelle Robène ou test de PCR temps réel Robène.

Pour ce faire, repiquer au moins une colonie typique (ou douteuse) par échantillon sur milieu LPGA. Laisser incubé à +28°C pendant environ 24h, pour obtenir une culture « fraîche » et se référer au §8.5.

Remarque : En cas de doute, ne pas hésiter à multiplier le nombre de repiquages de colonies pour l'identification par échantillon.

Quand l'isolement 3 secteurs donne lieu à des colonies suffisamment isolées, le repiquage peut être rendu optionnel, et l'identification PCR se faire directement à partir d'une colonie isolée prélevée sur la boîte d'isolement.

Les boîtes d'isolement et les souches isolées doivent être conservées selon les modalités indiquées dans le tableau 8.

8.5 Identification, par tests PCR, des souches isolées

Les tests moléculaires d'identification sont réalisés dans le respect de la méthode d'analyse MOA 022. Ils ne peuvent être appliqués qu'en respectant les préconisations de cette méthode.

Pour chaque test moléculaire d'identification, chaque souche isolée fait l'objet d'une suspension bactérienne et est déposée une fois, soit 1 puits par souche à identifier (analyse d'identification).

8.5.1 Préparation des suspensions bactériennes

Suspendre, à l'aide d'une anse d'inoculation stérile, environ 1µL de la culture fraîche de 24h d'une colonie typique de *Xcc* ou de *Xca* ou douteuse (ou, en l'absence de repiquage, suspendre directement la colonie isolée prélevée sur la boîte d'isolement) dans 1mL d'eau de qualité analytique stérilisée puis agiter vigoureusement pour obtenir une suspension bien homogène. Le tube peut alors être utilisé directement pour la réalisation de l'amplification ou stocké à une température inférieure ou égale à -18°C en attente de réalisation de l'amplification. Après utilisation, les tubes contenant les suspensions bactériennes sont conservés selon les modalités indiquées dans le tableau 8.

Remarque : A noter que l'étape de lyse thermique (ébullition du tube de la suspension bactérienne pendant au moins une minute puis mise dans la glace pendant quelques minutes et vortexage vigoureux) n'est pas obligatoire car elle n'est pas justifiée d'un point de vue technique, elle peut toutefois être réalisée notamment si elle est justifiée par des contraintes organisationnelles de niveau de confinement (manipulation de bactéries inactivées à l'issue de cette étape).

8.5.2 Amplification, électrophorèse et révélation

Deux tests moléculaires d'identification ciblant des parties différentes du génome doivent systématiquement être réalisés.

Pour la mise en œuvre des PCR conventionnelles d'identification, pour les conditions d'amplification, d'électrophorèse et de révélation, se référer aux indications des §8.3.2, §8.3.3 et §8.3.4.

Pour la mise en œuvre de la PCR temps réel d'identification Robène, pour les conditions d'amplification, se référer aux indications des §8.3.5.

9 Résultats

9.1 Contrôle de la validité des résultats

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.

9.1.1 Pour la détection *in planta* par PCR conventionnelle ou par PCR temps réel

L'analyse de PCR est validée si les conditions ci-dessous sont vérifiées.

Tableau 16 : Résultats attendus pour les différents témoins utilisés en PCR.

Type de contrôle	Résultats attendus**		
	Puits 1	Puits 2	Final
Témoin négatif de processus (TS)	-	-	NEGATIF
Témoin positif de processus (T+)	+	+	POSITIF
Témoin négatif d'amplification (A- ou Teau)	-	(-*)	NEGATIF

* La duplication de ce témoin est facultative.

** Le résultat d'un puits de PCR conventionnelle est positif s'il présente une bande à la taille attendue (cf. §5.2.3) et pas d'autre bande, il est négatif s'il ne présente aucune bande à la taille attendue.

Le résultat d'un puits de PCR temps réel est positif si, pour le marqueur Xcc, il présente une courbe d'amplification exponentielle et un Ct \leq cut-off (voir §9.2.2).

Le résultat d'un puits PCR est négatif si, pour le marqueur Xcc :

- il ne présente pas de courbe d'amplification
- ou s'il ne présente pas de Ct
- ou s'il présente une courbe non exponentielle
- ou s'il présente une courbe présentant une intersection avec la ligne seuil et un Ct > cut-off.

En plus de ces différentes conditions sur le marqueur Xcc, le marqueur plante doit donner lieu à une amplification positive pour confirmer l'absence d'inhibiteurs de PCR et pour valider le résultat négatif sur le marqueur Xcc.

9.1.2 Pour la détection *in planta* par isolement

Pour valider les résultats d'isolement issus des échantillons, il faut préalablement, dans le cadre de la lecture (§8.4.3) des boîtes de culture ensemencés pour les témoins :

- ▶ s'assurer de l'absence de colonies typiques de Xcc ou Xca sur les boîtes d'isolement du témoin négatif de processus ;
- ▶ et, lorsqu'un témoin positif de processus a été mis en œuvre pour l'isolement, s'assurer de la présence de colonies typiques de Xcc ou Xca sur les boîtes d'isolement du témoin positif de processus.

9.1.3 Pour l'identification, par PCR conventionnelle ou par PCR temps réel, des souches isolées

L'analyse de PCR d'identification est validée si les conditions ci-dessous sont vérifiées.

Tableau 17: Résultats attendus pour les différents témoins utilisés en PCR d'identification.

Type de contrôle	Résultat attendu*	
	Puits PCR	Final
Témoin négatif de processus (TS)	-	NEGATIF
Témoin positif de processus (T+)	+	POSITIF
Témoin négatif d'amplification (A- ou Teau)	-	NEGATIF

* Le résultat d'un puits de PCR conventionnelle est positif s'il présente une bande à la taille attendue (cf. §5.2.3) et pas d'autre bande, il est négatif s'il ne présente aucune bande à la taille attendue.

Le résultat d'un puits de PCR temps réel est positif si, pour le marqueur Xcc, il présente une courbe d'amplification exponentielle et un Ct \leq cut-off (voir §9.2.2).

Le résultat d'un puits PCR est négatif si, pour le marqueur Xcc:

- il ne présente pas de courbe d'amplification
- ou s'il ne présente pas de Ct
- ou s'il présente une courbe non exponentielle
- ou s'il présente une courbe présentant une intersection avec la ligne seuil et un Ct > cut-off.

Il est à noter que dans le cas de la PCR temps réel utilisée en identification sur souche isolée, le marqueur plante ne donne pas lieu à amplification (même si les amorces et sonde citrus ont été maintenues dans le mélange réactionnel).

9.2 Calculs et expression des résultats

9.2.1 Pour la détection *in planta* par PCR conventionnelle

Le résultat d'un puits PCR est positif s'il présente une bande à la taille attendue et pas d'autre bande.
Le résultat d'un puits PCR est négatif s'il ne présente aucune bande à la taille attendue.

Les résultats s'interprètent de la manière suivante :

Tableau 18 : Interprétation des résultats des échantillons en PCR.

Analyse		Résultat	Interprétation
Puits 1	Puits 2		
+	+	POSITIF	Test positif
+	-	PCR à refaire. Si à nouveau au moins 1 positif sur 2, le test est interprété comme positif.	
-	-	NEGATIF	Test négatif

Avertissement : Pour la PCR conventionnelle Mavrodieva, il est possible d'observer de façon aléatoire (1 puits sur 2) de très faibles bandes d'amplification à la taille attendue. Ces amplifications sont à considérer comme artefacts et à interpréter comme résultat négatif.

La figure 4 ci-dessous illustre les résultats d'électrophorèse des produits PCR sur gel d'agarose pour des échantillons analysés par PCR conventionnelle Mavrodieva et par PCR conventionnelle Robène.

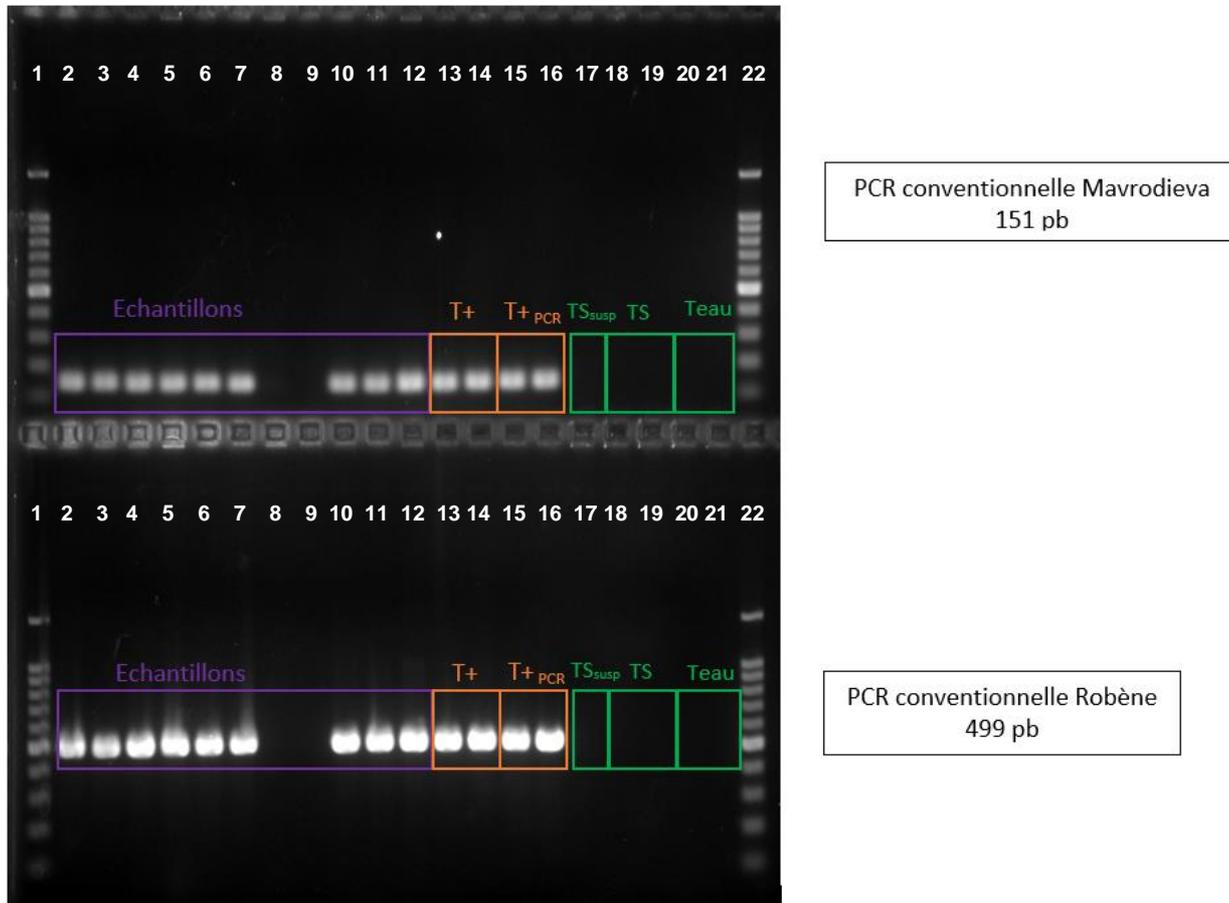


Figure 4 : Exemple de résultats d'électrophorèse de gel d'agarose après migration et révélation au bromure d'éthidium sous UV, permettant la visualisation des produits PCR résultant de la PCR conventionnelle Mavrodieva et de la PCR conventionnelle Robène (source Anses LSV).

Légende : puits 1 et 22 : marqueur de taille 100 pb ; puits 2 à 7 : 3 échantillons positifs Xcc déposés en duplicat (PCR de détection in planta) ; puits 8-9 : 1 échantillon négatif Xcc et Xca déposé en duplicat (PCR de détection in planta) ; puits 10 à 12 : 3 suspensions bactériennes positives Xcc (PCR d'identification sur souche isolée) ; puits 13-14 : témoin positif de processus (PCR de détection in planta) ; puits 15-16 : témoin positif de PCR ; puits 17 : témoin négatif de processus pour l'identification des suspensions bactériennes (PCR d'identification sur souche isolée) ; puits 18-19 : témoin négatif de processus (PCR de détection in planta) ; puits 20-21 : témoin négatif de PCR.

9.2.2 Pour la détection *in planta* par PCR temps réel Robène

Le résultat d'un puits PCR est positif si, pour le marqueur Xcc, il présente une courbe d'amplification exponentielle et un Ct \leq cut-off.

Le résultat d'un puits PCR est négatif si, pour le marqueur Xcc,

- il ne présente pas de courbe d'amplification,
- ou s'il ne présente pas de Ct,
- ou s'il présente une courbe non exponentielle
- ou s'il présente une courbe présentant une intersection avec la ligne seuil et un Ct > cut-off².

² Une valeur de cut-off peut être définie si nécessaire, pour éviter des résultats faussement positifs en particulier si des valeurs élevées de Ct sont observées et peuvent être interprétées comme des artefacts d'amplification ou de fluorescence ou des contaminations. La

En plus de ces différentes conditions sur le marqueur *Xcc*, le marqueur plante doit donner lieu à une amplification positive pour confirmer l'absence d'inhibiteurs de PCR et pour valider le résultat négatif sur le marqueur *Xcc*.

Ainsi pour chaque puits PCR, le résultat du test basé sur les 2 marqueurs s'interprète de la façon suivante :

Tableau 19 : Interprétation des résultats de PCR temps réel par puits, selon les 2 marqueurs.

		Résultat pour le contrôle interne plante (VIC)	
		Positif	Négatif
Résultat pour la cible <i>Xcc</i> (FAM)	Positif	Positif	
	Négatif	Négatif	Réitération de la PCR temps réel en diluant les extraits d'ADN au 1/10^{ème} Si le résultat de la seconde PCR est identique à celui de la première PCR, le résultat n'est pas interprétable (présence d'inhibiteurs de la PCR)

Les résultats pour les 2 puits s'interprètent de la manière suivante :

Tableau 20 : Interprétation des résultats des échantillons en PCR temps réel.

Analyse		Résultat	Interprétation
Puits 1	Puits 2		
+	+	POSITIF	Test positif
+	-	PCR à refaire. Si à nouveau au moins 1 positif sur 2, le test est interprété comme positif.	
-	-	NEGATIF	Test négatif

9.2.3 Pour l'identification, par PCR conventionnelle, des souches isolées

Le résultat d'un puits PCR est positif s'il présente une bande prononcée à la taille attendue³ et pas d'autre bande.

Le résultat d'un puits PCR est négatif s'il ne présente aucune bande à la taille attendue.

Les résultats s'interprètent de la manière suivante :

valeur de cut-off doit être définie (ou vérifiée) dans chaque laboratoire lors de la première mise en œuvre du test. Une approche basée sur l'analyse de la courbe de ROC (receiver operating characteristic) peut être utilisée pour définir la valeur de cut-off.

*À titre indicatif, la valeur de cut-off a été définie à 38, pour la détection de *Xcc*, dans les conditions expérimentales du laboratoire qui a réalisé la validation interne de la méthode.*

³ La cible est en effet présente de façon excédentaire (PCR d'identification), impliquant l'absence d'ambiguïté dans la visibilité de la bande d'amplification.

Tableau 23 : Interprétation des résultats des échantillons en PCR temps réel d'identification.

Analyse	Résultat	Interprétation
Puits		
+	POSITIF	Test positif
-	NEGATIF	Test négatif

Tout échantillon présentant au moins une souche isolée positive est considéré comme positif.

Toute souche bactérienne identifiée positivement doit être conservée selon les modalités indiquées dans le tableau 8.

9.2.5 Pour la méthode globalement

Le schéma de détection de *Xcc* et *Xca* implique la mise en œuvre simultanément de **3 tests de détection** (1 test d'isolement + 2 test moléculaires de détection) **et, selon le résultat de l'isolement, de 2 tests moléculaires d'identification** (cf. figure 2) :

Les résultats combinés de ces tests s'interprètent selon les éléments présentés dans le tableau 24 pour les aspects de détection et selon les éléments présentés dans le tableau 25 pour les aspects d'identification. Le tableau 26 permet d'avoir une vision globale sur la formulation du résultat final de détection pour *Xcc* et *Xca*, selon les différents cas de figure théoriquement possibles résultant de la combinaison des différents tests analytiques de détection et d'identification mis en œuvre dans le cadre de la méthode.

Tableau 24 : Interprétation des résultats combinés des tests de détection.

		Test de détection par PCR conventionnelle Robène <i>in planta</i> ou par test de PCR temps réel Robène <i>in planta</i>	
		POSITIF	NEGATIF
Test de détection par PCR conventionnelle <i>Mavrodieva in planta</i>	POSITIF	<i>X. citri</i> pv. <i>citri</i> détecté <i>X. citri</i> pv. <i>aurantifolii</i> non détecté	<i>X. citri</i> pv. <i>citri</i> non détecté <i>X. citri</i> pv. <i>aurantifolii</i> suspecté
	NEGATIF	Résultats incohérents	<u>Si le test de détection par isolement est également négatif :</u> <i>X. citri</i> pv. <i>citri</i> non détecté et <i>X. citri</i> pv. <i>aurantifolii</i> non détecté

Ainsi ***Xcc* et *Xca* sont non détectés** dans les échantillons pour lesquels les 3 tests de détection (le test d'isolement et les 2 tests moléculaires de détection) sont négatifs.

***Xcc* est détecté et *Xca* est non détecté** dans les échantillons pour lesquels les 2 tests moléculaires de détection ciblant des parties différentes du génome (test moléculaire Robène et test moléculaire *Mavrodieva*) sont positifs.

Xca est suspecté et Xcc est non détecté dans les échantillons pour lesquels seul le test moléculaire de détection Mavrodieva est positif.

Enfin les résultats sont considérés comme **incohérents** si le test moléculaire de détection Robène est positif et que le test moléculaire de détection Mavrodieva est négatif.

Dans ce cas, l'analyse doit être réitérée (éventuellement, et si cela est possible et pertinent, à partir de la prise d'essai).

Si les résultats obtenus sont à nouveau incohérents, il convient de prendre l'attache du Laboratoire National de Référence pour envisager la conduite à tenir.

Tableau 25 : Interprétation des résultats combinés des tests moléculaires d'identification.

		Test d'identification par PCR conventionnelle Robène sur souche isolée ou par test de PCR temps réel Robène sur souche isolée	
		POSITIF	NEGATIF
Test d'identification par PCR conventionnelle Mavrodieva sur souche isolée	POSITIF	X. citri pv. citri détecté et identifié X. citri pv. aurantifolii non détecté	X. citri pv. citri non détecté X. citri pv. aurantifolii suspecté
	NEGATIF	Résultats incohérents	<p>Si les tests moléculaires de détection sont également négatifs :</p> <p>X. citri pv. citri non détecté et X. citri pv. aurantifolii non détecté</p> <p>Si le(s) test(s) moléculaire(s) de détection correspondant(s) est (sont) positif(s), 2 cas cohérents sont possibles :</p> <p>(i) X. citri pv. citri détecté mais non identifié et X. citri pv. aurantifolii non détecté ⁽¹⁾</p> <p>(ii) X. citri pv. citri non détecté et X. citri pv. aurantifolii suspecté ⁽²⁾</p>

⁽¹⁾ Cas des échantillons pour lesquels les 2 tests moléculaires de détection ciblant des parties différentes du génome (test moléculaire Robène et test moléculaire Mavrodieva) sont positifs.

⁽²⁾ Cas des échantillons pour lesquels seul le test moléculaire de détection Mavrodieva est positif.

Xcc est détecté et identifié et Xca est non détecté dans les échantillons pour lesquels les 2 tests moléculaires d'identification réalisées sur souches isolées et ciblant des parties différentes du génome (test moléculaire Robène et test moléculaire Mavrodieva) sont positifs.

Xca est suspecté et Xcc est non détecté dans les échantillons pour lesquels seul le test moléculaire d'identification Mavrodieva est positif⁵.

Xcc est détecté mais non identifié et Xca est non détecté dans les échantillons :

- pour lesquels les 2 tests moléculaires de détection ciblant des parties différentes du génome (test moléculaire Robène et test moléculaire Mavrodieva) sont positifs.
- mais pour lesquels les 2 tests moléculaires d'identification réalisées sur souches isolées et ciblant des parties différentes du génome (test moléculaire Robène et test moléculaire

⁵ Le laboratoire devra prendre l'attache du LNR pour confirmation d'identité.

Mavrodieva) sont négatifs. A noter que l'absence de colonie avec morphologie typique ou douteuse équivaut à un résultat d'identification négatif.

Enfin les résultats sont considérés comme **incohérents** si le test moléculaire d'identification Robène (réalisé sur souche isolée) est positif et que le test moléculaire d'identification Mavrodieva (réalisé sur souche isolée) est négatif.

Dans ce cas, l'analyse doit être réitérée (éventuellement, et si cela est possible et pertinent, à partir de la prise d'essai).

Si les résultats obtenus sont à nouveau incohérents, il convient de prendre l'attache du Laboratoire National de Référence pour envisager la conduite à tenir.

Le tableau 26 répertorie tous les cas de figure théoriquement possibles résultant de la combinaison des résultats des différents tests de détection et d'identification mis en œuvre dans le cadre de la méthode et permet d'identifier le résultat final à apporter relativement à la détection de *Xcc* et relativement à la détection de *Xca*.

Tableau 26 : Interprétation du résultat final de la méthode relativement à la détection de *Xcc* et *Xca* pour toutes les combinaisons théoriquement possibles de résultats obtenus en mettant en œuvre les différents tests composant la méthode.

Combinaison théoriquement possible de résultats	Détection par PCR <i>in planta</i>		Détection par isolement + PCR d'identification ⁽¹⁾		Résultat final <i>Xcc</i>	Résultat final <i>Xca</i>
	PCR Robène conv. (ou temps réel) <i>in planta</i>	PCR conv. Mavrodieva <i>in planta</i>	PCR Robène conv. (ou temps réel) sur souches isolées	PCR conv. Mavrodieva sur souches isolées		
1	-	-	-	-	<i>Xcc</i> non détecté	<i>Xca</i> non détecté
2	-	+	-	-	<i>Xcc</i> non détecté	<i>Xca</i> suspecté
3	-	+	-	+	<i>Xcc</i> non détecté	<i>Xca</i> suspecté
3bis			-	+	<i>Xcc</i> non détecté	<i>Xca</i> suspecté
4	+	+	-	-	<i>Xcc</i> détecté mais non identifié	<i>Xca</i> non détecté
5	+	+	+	+	<i>Xcc</i> détecté et identifié	<i>Xca</i> non détecté
5bis			+	+	<i>Xcc</i> détecté et identifié	<i>Xca</i> non détecté
6	-	-	-	+	Résultat incohérent	
7	-	-	+	-	Résultat incohérent	
8	-	-	+	+	Résultat incohérent	
9	+	-	-	-	Résultat incohérent	
10	+	-	-	+	Résultat incohérent	
11	-	+	+	-	Résultat incohérent	
12	-	+	+	+	Résultat incohérent	
13	+	-	+	-	Résultat incohérent	
14	+	-	+	+	Résultat incohérent	
15	+	+	-	+	Résultat incohérent	
16	+	+	+	-	Résultat incohérent	

⁽¹⁾ À noter que l'absence de colonie avec morphologie typique ou douteuse équivaut à un résultat d'identification négatif.

Sont surlignés en vert, les combinaisons cohérentes permettant d'apporter un résultat final.

Les combinaisons « bis » : 3bis et 5bis correspondent à des situations où le test de détection par isolement est réalisé en premier et donne lieu à un test d'identification positif permettant d'apporter un résultat final par rapport à la méthode sans avoir à mettre en œuvre les tests de détection par PCR *in planta*. À noter que ce sont les 2 seules situations permettant de conclure uniquement à partir du test d'isolement suivi des PCR d'identification, mais sans la mise en œuvre des tests de détection par PCR *in planta*.

Reliquats d'échantillons : Voir §7.3.

9.2.6 Formulation du résultat sur le rapport d'analyse

Le rapport d'analyse présentera un résultat d'analyse pour les 2 bactéries ciblées par la méthode.

Pour *X. citri* pv. *citri*, le résultat sera sous la forme : non détecté / détecté / détecté et identifié / détecté mais non identifié / résultats incohérents (ou une formulation équivalente).

Pour *X. citri* pv. *aurantifolii*, le résultat sera sous la forme : non détecté / suspecté / résultats incohérents (ou une formulation équivalente).

Le rapport devra par ailleurs faire mention de la technique de biologie moléculaire utilisée, selon la formulation suivante (ou une formulation équivalente).

- ▶ Méthode d'analyse utilisée : ANSES/LSV/MA 068 - Détection de *Xanthomonas citri* pv. *citri* et *Xanthomonas citri* pv. *aurantifolii* sur plantes hôtes de la famille des Rutacées par PCR et par isolement, suivie d'une identification, par PCR, des souches isolées – utilisation du schéma PCR conventionnelle pour la détection et l'identification
- ▶ Méthode d'analyse utilisée : ANSES/LSV/MA 068 - Détection de *Xanthomonas citri* pv. *citri* et *Xanthomonas citri* pv. *aurantifolii* sur plantes hôtes de la famille des Rutacées par PCR et par isolement, suivie d'une identification, par PCR, des souches isolées – utilisation du schéma PCR conventionnelle et PCR temps réel pour la détection et utilisation du schéma de PCR conventionnelle pour l'identification
- ▶ Méthode d'analyse utilisée : ANSES/LSV/MA 068 - Détection de *Xanthomonas citri* pv. *citri* et *Xanthomonas citri* pv. *aurantifolii* sur plantes hôtes de la famille des Rutacées par PCR et par isolement, suivie d'une identification, par PCR, des souches isolées – utilisation du schéma PCR conventionnelle et PCR temps réel pour la détection et l'identification
- ▶ Méthode d'analyse utilisée : ANSES/LSV/MA 068 - Détection de *Xanthomonas citri* pv. *citri* et *Xanthomonas citri* pv. *aurantifolii* sur plantes hôtes de la famille des Rutacées par PCR et par isolement, suivie d'une identification, par PCR, des souches isolées – utilisation du schéma PCR conventionnelle pour la détection et utilisation du schéma de PCR conventionnelle et PCR temps réel pour l'identification ;

On notera que cette dernière modalité est a priori peu pertinente car elle ne valorise par le contrôle interne associé à la PCR temps réel.

10 Caractéristiques de performance de la méthode

Synthèse des caractéristiques de performance extraite du rapport de validation établi par le LNR sous la référence Rapport de validation interne Xcc 2022.

Tableau 27 : Synthèse des caractéristiques de performance de la méthode de détection de *Xanthomonas citri* pv. *citri* et *Xanthomonas citri* pv. *aurantifolii* sur plantes hôtes de la famille des Rutacées par PCR et par isolement, suivie d'une identification, par PCR, des souches isolées.

Caractéristique	Paramètre	Valeur ou résultat obtenu lors de la caractérisation			Principales informations relatives aux modalités de réalisation de la caractérisation
		PCR conv. Robène	PCR temps réel Robène	PCR conv. Mavro-dieva	
Inclusivité	Pourcentage d'échantillons détectés parmi les échantillons cibles	100% (souches Xcc: A/A*/A*)	100% (souches Xcc: A/A*/A*)	100% (souches Xcc et Xca: A/A*/A*/B/C)	83 échantillons cibles (souches bactériennes cibles) testés en duplicat représentatifs de la diversité géographique, génétique, d'une diversité de plantes hôtes et d'années d'isolement.
Exclusivité	Pourcentage d'échantillons non détectés parmi les échantillons non-cibles	100%	98%	83%	46 échantillons non-cibles (souches bactériennes principalement) testés en duplicat.
Spécificité analytique	Pourcentage de vrais positifs et de vrais négatifs parmi des échantillons cibles et des échantillons non-cibles	100%	99%	94%	83 échantillons cibles (souches bactériennes cibles) testés en duplicat et 46 échantillons non-cibles (souches bactériennes principalement) testés en duplicat.
Sensibilité analytique ou seuil de détection	Niveau de concentration le plus bas pour lequel tous les résultats (100%) sont positifs	[3.10 ³ ; 3.10 ⁴] CFU.mL ⁻¹	[3.10 ² ; 3.10 ⁴] CFU.mL ⁻¹	[3.10 ³ ; 3.10 ⁵] CFU.mL ⁻¹	5 niveaux de contamination (0-10 ² -10 ³ -10 ⁴ -10 ⁵) CFU.mL ⁻¹ x 6 espèces de <i>Citrus</i> x 2 matrices (feuilles, fruits) x 1 souche cible et 6 niveaux de contamination (0-10 ² -10 ³ -10 ⁴ -10 ⁵ -10 ⁶) CFU.mL ⁻¹ x 1 espèce de <i>Citrus</i> x 2 matrices x 6 souches cibles, (souches différentes représentatives de la diversité)
Répétabilité	Pourcentage d'accords entre réplicats d'un même échantillon.	98%	96%	93%	Test interlaboratoire comprenant 18 laboratoires différents et portant sur 24 extraits d'ADN (4 échantillons non-cibles, 4 échantillons cibles Xca et 16 échantillons cibles Xcc à différents niveaux de contamination, ces échantillons étant présents entre 1 à 3 exemplaires dans le panel pour faire un total de 24).
Reproductibilité	Probabilité de trouver le même résultat pour deux échantillons identiques analysés dans deux laboratoires différents.	92%	87%	83%	

Annexe 1 – Recette des milieux utilisés pour la détection de Xcc et Xca

Milieu LPGA :

Extrait de levure: 7,0 g
Bactopeptone: 7,0 g
Glucose: 7,0 g
Agar: 18,0 g
Eau distillée: 1,0 L
pH = 7,2.

A titre indicatif, l'ajout de 3ml de soude 1N par litre de milieu permet d'obtenir un pH d'environ 7,2

Stériliser par autoclavage.

Remarque : Après autoclavage et avant de couler le milieu en cours de refroidissement mais encore en surfusion à une température $\leq 50^{\circ}\text{C}$, possibilité d'incorporer un antifongique (par exemple : cycloheximide à 50 mg/L ou propiconazole à 20 mg/L).

Milieu LPGA-KC :

Extrait de levure : 7,0 g
Bactopeptone : 7,0 g
Glucose : 7,0 g
Agar : 18,0 g
Eau distillée : 1,0 L
pH = 7,2.

A titre indicatif, l'ajout de 3ml de soude 1N par litre de milieu permet d'obtenir un pH d'environ 7,2.

Stériliser par autoclavage.

Après autoclavage et avant de couler le milieu, ajouter stérilement les antibiotiques et produits suivants à partir de solutions mères au milieu en cours de refroidissement (mais encore en surfusion à une température $\leq 50^{\circ}\text{C}$):

Kasugamycine: 20 mg
Céphalexine⁶: 40 mg

Remarque : A ce stade de préparation, il est aussi possible d'incorporer un antifongique (par exemple : cycloheximide à 50 mg/L ou propiconazole à 20 mg/L).

⁶ Dilution dans la soude

Milieu SPA modifié :

Saccharose: 10,0 g
Peptone: 7,0 g
K₂HPO₄: 0,5 g
MgSO₄: 0,3 g
Agar: 15,0 g
Eau distillée: 1,0 L
pH = 7,2.

Stériliser par autoclavage.

Remarque : Après autoclavage et avant de couler le milieu en cours de refroidissement mais encore en surfusion à une température $\leq 50^{\circ}\text{C}$, possibilité d'incorporer un antifongique (par exemple : cycloheximide à 50 mg/L ou propiconazole à 20 mg/L).

Bibliographie

Baker, R., Bragard, C., Candresse, T., Gilioli, G., Grégoire, J.C., Holb, I., Jeger, M.J., Karadjova, O.E., Magnusson, C., Makowski, D., Manceau, C., Navajas, M., Rafoss, T., Rossi, V., Schans, J., Schrader, G., Urek, G., Van Lenteren, J.C., Vloutoglou, I., Winter, S., Van der Werf, W., Pruvost, O., Schans, J., Vernière, C., Kozelska, S., Goumperis, T., Schulz, O.M. (2014). Scientific Opinion on the risk to plant health of *Xanthomonas citri* pv. *citri* and *Xanthomonas citri* pv. *aurantifolii* for the EU territory. EFSA Journal. 12, 3556.

Canteros BI, Zagory D, Stall RE (1985) A medium for cultivation of the B - strain of *Xanthomonas campestris* pv. *citri*, cause of canker B in Argentina and Uruguay. Plant Disease 69, 122-3.

Canteros BI, Gochez AM and Moschini RC (2017). Management of citrus canker in Argentina, a success story. Plant Pathology Journal, 33, 441-449.

Cubero, J. & Graham, J.H. (2002). Genetic relationship among worldwide strains of *Xanthomonas* causing canker in Citrus species and design of new primers for their identification by PCR. Applied & Environmental Microbiology, Vol. 68 (3), 1257–1264.

Cubero, J. & Graham, J.H. (2004). The leucine-responsive regulatory protein (lrp) gene for characterization of the relationship among *Xanthomonas* species. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 54, 429–437.

Delcourt, S., Vernière, C., Boyer C., Pruvost, O., Hostachy, B. & Robène-Soustrade, I. (2013). Revisiting the specificity of PCR primers for diagnostics of *Xanthomonas citri* pv. *citri* by experimental and in silico analyses. Plant Diseases, 97(3), 373–8.

EFSA (European Food Safety Authority), 2019. Pest survey card on *Xanthomonas citri* pv. *citri* and pv. *aurantifolii*. EFSA supporting publication 2019: EN-1587, 25 pp.

EPPO (2023). PM7/44 (2) Diagnostic. *Xanthomonas citri* pv. *citri* and *Xanthomonas citri* pv. *aurantifolii*. OEPP/EPPO Bulletin 53, 62–96.

EPPO (2019) PM 7/98 (4) Specific requirements for laboratories preparing accreditation for a plant pest diagnostic activity. OEPP/EPPO Bulletin 49, 530–563.

EPPO (2014) PM 7/122 (1) Guidelines for the organization of interlaboratory comparisons by plant pest diagnostic laboratories. OEPP/EPPO Bulletin 48, 373–377.

Escalon, A., Javegny, S., Vernière, C., Noël, L.D., Vital, K., Poussier, S., Hajri, A., Boureau, T., Pruvost, O., Arlat, M. & Gagnevin, L. (2013). Variations in type III effector repertoires, pathological phenotypes and host range of *Xanthomonas citri* pv. *citri* pathotypes. Molecular Plant Pathology, 14(5), 483–496.

Goto, M. (1992). Citrus canker. In J. Kumer, H.S. Chaube, U.S. Singh and A.N. Mukhopadhyay (sous la direction de). Plant diseases of international importance, Vol. III, Diseases of fruit crops, pp. 170–208. Upper Saddle River, NJ, Prentice Hall.

IPPC (2014) ISPM 27. Annex 6. *Xanthomonas citri* subsp. *citri*. IPPC, FAO, 1-12.

Mavrodiéva V., Levy L. & Gabriel D. (2004). Improved sampling methods for real-time polymerase chain reaction diagnosis of Citrus canker from field samples. Phytopathology, Vol 94 (1), 61-68.

Pruvost, O., Roumagnac, P., Gaube, C., Chiroleu, F. & Gagnevin, L. (2005). New media for the semi-selective isolation and enumeration of *Xanthomonas campestris* pv. *mangiferaeindicae*, the causal agent of mango bacterial black spot. Journal of Applied Microbiology 99, 803-15.

Pruvost O, Goodarzi T, Boyer K, Soltaninejad H, Escalon A, Alavi SM, et al. (2015). Genetic structure analysis of strains causing citrus canker in Iran reveals the presence of two different lineages of *Xanthomonas citri* pv. *citri* pathotype A*. *Plant Pathology*, 64 (4), 776–84.

Robène I., Maillot-Lebon V., Chabirand A., Moreau A., Becker N., Moumène A., Rieux A., Campos P., Gagnevin L., Gaudeul M., Baider C., Chiroleu F. & Pruvost, O. (2020). Development and comparative validation of genomic-driven PCR-based assays to detect *Xanthomonas citri* pv. *citri* in citrus plants. *BMC Microbiology* 20, 296.

Sun, X., Stall, R.E., Jones, J.B., Cubero, J., Gottwald, T.R., Graham, J.H., Dixon, W.D., Schubert, T.S., Chaloux, P.H., Stromberg, V.K., Lacy, G.H. & Sutton, B.D. (2004). Detection and characterization of a new strain of citrus canker bacteria from Key/Mexican lime and alemow in South Florida. *Plant Disease*, 88(11), 1179–1188.

Trontin C., Agstner B., Altenbach D., Anthoine G., Baginska H., Brittain I., Chabirand A., Chappe A. M., Dahlin P., Dreo T., Freye-Minks C., Gianinazzi C., Harrison C., Jones G., Luigi M., Massart S., Mehle N., Mezzalama M., Mouaziz H., Petter F., Ravnikar M., Raaymakers T. M., Renvoise J. P., Rolland M., Santos Paiva M., Seddas S., van der Vlugt R. & Vucurovic, A. (2021). VALITEST: Validation of diagnostic tests to support plant health. *Bulletin OEPP/EPPO Bulletin* 51 (1), 198–206.

Vernière, C., Hartung, J.S., Pruvost, O.P., Civerolo, E.L., Álvarez, A.M., Maestri, P. & Luisetti, J. (1998). Characterization of phenotypically distinct strains of *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri* from Southwest Asia. *European Journal of Plant Pathology*, 104, 477–487.