

Méthode d'analyse en santé des végétaux

RÉFÉRENCE : ANSES/LSV/MA060 - Version 1

Mai 2019

Détection du *Banana bunchy top virus* sur bananier par PCR conventionnelle

Laboratoire de la Santé des Végétaux

Laboratoire national de référence « Virus sur bananier et plantes tropicales »



Historique de la méthode

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

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

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

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

Version	Nature des modifications (majeure/mineure)	Date	Principales modifications
v1**	initiale	Mai 2019	Version initiale. A noter toutefois que cette méthode a déjà été publiée par le passé (MOA014 version 2 partie B*) puis supprimée dans le cadre de la mise en forme de la MOA014 selon un format harmonisé commun à l'ensemble des méthodes de l'ANSES.

* La MOA 014 version 2 partie B a fait l'objet d'une consultation de mai à octobre 2012 notamment auprès des laboratoires agréés français.

** Cette méthode a fait l'objet d'une consultation du 07 au 20 mai 2019 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) « Virus sur bananier et 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 des rapports de validation (BBTV_2012 et BBTV février 2014-V01). Les rapports de validation, ainsi que la méthode ont été revus par des pairs scientifiques, ainsi que l'unité de coordination de la référence du LSV.



Sommaire

Avant-propos	3
Introduction	6
Avertissements et précautions de sécurité	6
1. Objet et domaine d'application	7
2. Documents de référence	7
3. Termes, sigles et définitions	7
4. Principe de la méthode	8
5. Réactifs	9
5.1 Eau.....	9
5.2 Réactifs de biologie moléculaire	9
5.3 Tampons	10
5.4 Autres réactifs et consommables	10
5.5 Contrôles et témoins	10
6. Appareillage et matériels	12
6.1 Broyeur	12
6.2 Thermocycleur pour PCR point final	12
7. Échantillons	13
7.1 Conditions d'acceptation des échantillons	13
7.2 Conservation des échantillons avant analyse	13
7.3 Conservation des échantillons ou reliquats après analyse.....	13
8. Mode opératoire	14
8.1 Préparation des échantillons pour analyse	14
8.2 Broyage de l'échantillon.....	15
8.3 Extraction d'ADN	16
8.4 Amplification – PCR	16
8.4.1 Préparation du mélange réactionnel	16
8.4.2 Électrophorèse et Révélation	17
9. Résultats	18
9.1 Contrôle de la validité des résultats	18
9.2 Calculs et expression des résultats	19



9.2.1 Détection AVEC TIA.....	19
9.2.2 Détection SANS TIA.....	19
10. Caractéristiques de performance de la méthode.....	21
Bibliographie.....	22



Introduction

Le *Banana bunchy top virus* (BBTV) est un organisme nuisible, agent responsable de la maladie du sommet buissonnant du bananier, maladie virale des bananiers actuellement considérée comme une des plus graves.

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 produits utilisés dans cette méthode peuvent présenter un risque pour l'opérateur et/ou pour l'environnement. Il convient de suivre les recommandations du fournisseur pour l'utilisation de ces produits et l'élimination des déchets et de se référer aux fiches de données de sécurité en vigueur.

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) doit être détruit par autoclavage ou autre moyen inactivant les virus.

Les consommables ayant été en contact avec le matériel végétal infecté (ou de statut indéterminé) doivent être détruits par autoclavage ou autre moyen inactivant les virus.

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



1. Objet et domaine d'application

Les isolats du BBTV collectés dans différentes régions du monde sont sérologiquement étroitement apparentés, bien que des informations basées sur l'analyse de séquences génomiques laissent à penser qu'il existe deux groupes phylogénétiques distincts (Karan, et al., 1994) :

- les isolats d'Australie, d'Afrique, du Pacifique Sud et d'Inde (groupe Pacifique Sud) ;
- les isolats de l'Asie du Sud-Est : Philippines, Taiwan et Viêt-nam (groupe Asie).

La méthode décrite ci-dessous permet de détecter la présence du BBTV par technique moléculaire PCR conventionnelle (Polymerase Chain Reaction).

Il s'agit d'une méthode qualitative, c'est à dire dont la réponse est soit la présence, soit l'absence de l'organisme cible détecté dans une quantité d'échantillon donnée et dans la limite du seuil de détection de la technique employée.

Les échantillons pour lesquels une réponse négative est obtenue sont considérés comme indemnes de la maladie ou contaminés à un niveau trop faible pour être mis en évidence par la méthode. Les échantillons pour lesquels une réponse positive est obtenue sont considérés comme contaminés.

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] Dossier d'évaluation BBTV_2012 développement, évaluation et validation de différentes méthodes de détection par biologie moléculaire du *Banana bunchy top virus* sur bananier *Musa ssp*
- [3] Rapport de validation BBTV février 2014-V01 – Possibilité de regroupement des échantillons pour la détection du BBTV par les méthodes de PCR et PCR temps réel

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...).

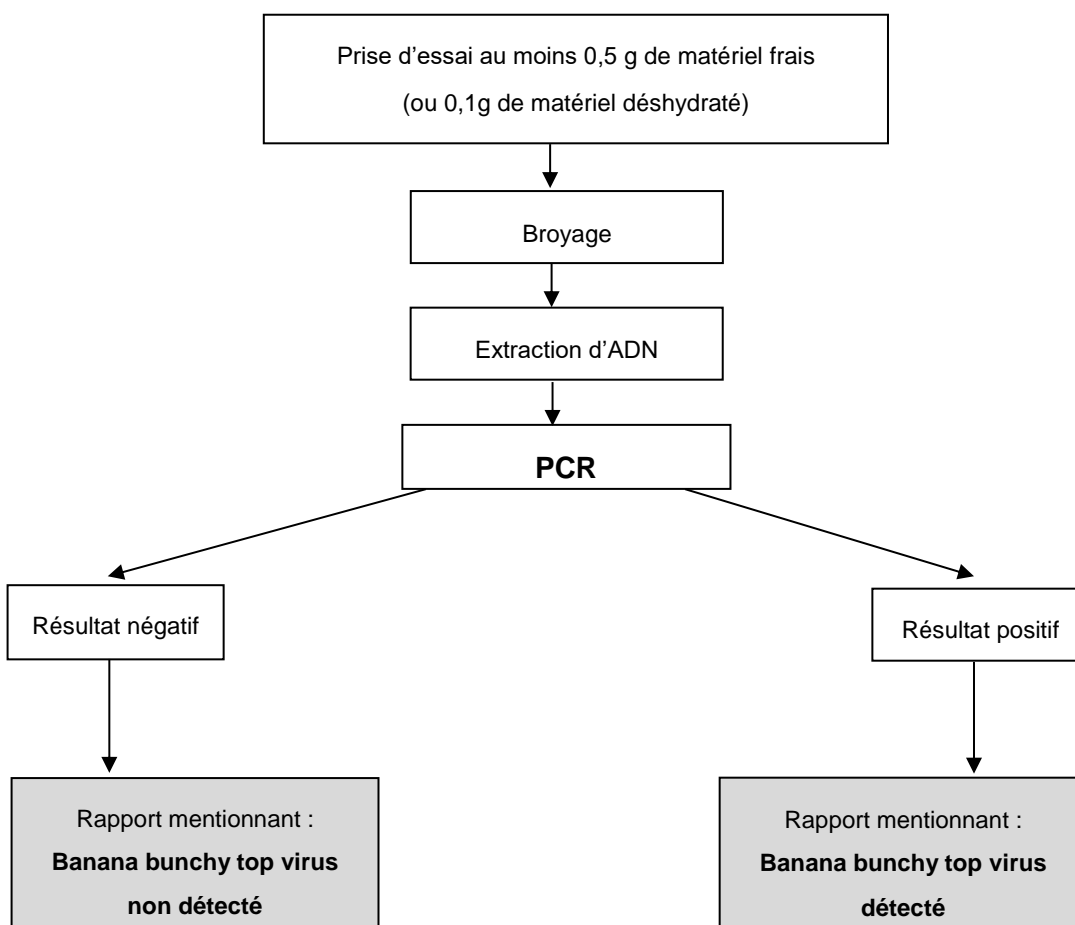
Le glossaire MOA GLO 001 reprend les principales définitions. L'attention des lecteurs est attirée sur le fait que les termes intégrés au glossaire ne sont, en règle générale, pas spécifiquement repérés dans le corps de la méthode d'analyse.

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



4. Principe de la méthode

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





5. Réactifs

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

En règle générale, l'opérateur doit veiller (par l'utilisation de produits et consommables certifiés, nettoyage, stérilisation ou tout autre traitement approprié) à l'absence dans l'eau, produits et consommables utilisés, de contamination (ADN ou ARN), de nucléase, d'inhibiteur de la PCR 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 les plus optimales.

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

5.1 Eau

L'eau utilisée pour la préparation des tampons, 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 (préparation des mix, dilution des ampliâts) doit présenter une qualité suffisante pour une utilisation en biologie moléculaire (eau ultrapure).

5.2 Réactifs de biologie moléculaire

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

Ces réactifs doivent être utilisés et pour certains contrôlés conformément à la méthode officielle d'analyse MOA 022.

Un conseil pour le choix des fournisseurs peut être apporté par le laboratoire de référence. Il est recommandé de contacter celui-ci en cas de doute sur le réactif adéquat.



5.3 Tampons

Composition et préparation :

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

- Tampon de broyage (type GEB)
- Tampons d'extraction (exemple ceux du kit DNeasy® Plant mini kit de Qiagen)
- Tampon de migration (exemple TAE ou TBE 10X)
- Tampon de charge (si celui-ci n'est pas intégré au tampon du master mix cf remarque §4.3.1)

Les tampons utilisés doivent être ceux préconisés par le fournisseur de réactifs.

Le laboratoire peut aussi fabriquer certains tampons. Pour cela, le laboratoire se référera au répertoire des recettes en vigueur au Laboratoire de la santé des végétaux (REP-001).

Conservation :

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

5.4 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 de volume adapté au thermocycleur utilisé.

Éthanol 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, de broyage et d'isolement.

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

5.5 Contrôles et témoins

Des échantillons de référence doivent être inclus en cours de processus analytique pour valider les différentes étapes de la méthode. Conformément aux exigences de la méthode officielle d'analyse MOA 022, ces références sont constituées de :

- **un témoin négatif de processus (TS)** : 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 de bananiers non infectées). **10 /22**



- **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 de bananiers infectées). Il donne au minimum l'assurance d'un déroulement correct de la manipulation. Pour chaque série d'analyses, on peut soit utiliser des échantillons végétaux contaminés (si possible *Musa spp*) préparés au laboratoire (échantillons de référence naturellement contaminés) ou des témoins commerciaux positifs (lyophilisés, glycérolés...) à préparer selon les recommandations du fournisseur.
- **un témoin interne d'amplification (TIA) OPTIONNEL** : ce témoin correspond à une solution calibrée de plasmides contenant les séquences cible des 2 amorces dirigées vers le BBTV (F et R BBTV Rep1). L'amplifiât obtenu à partir de ce plasmide a une taille différente de celui obtenu à partir du virus. Ce témoin est rajouté au mélange réactionnel et sera donc présent dans chaque puits. Il sera alors amplifié en même temps que le pathogène cible avec les mêmes amorces que la cible, et ceci, dans chaque puits. Ce témoin permet de mettre en évidence les échantillons qui ne seraient pas exploitables par PCR du fait de la présence d'inhibiteurs dans l'extrait (évite ainsi les faux négatifs). Attention, le TIA sera amplifié même dans le témoin négatif d'amplification.

En complément d'un témoin malade (T+) à concentration virale 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 de petites 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 commerciaux utilisés à une dilution appropriée, lorsqu'ils existent et sont disponibles, ou de témoins dont le statut a été établi en interne.

- **un témoin négatif de PCR (A- ou T eau)** : 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.

D'autres contrôles peuvent être ajoutés si nécessaire et sont définis dans la méthode officielle d'analyse MOA 022. L'utilisation de ces références sert à valider le bon déroulement des différentes étapes de l'analyse ainsi que les résultats obtenus sur les différentes plaques. Leur observation et/ou lecture et conformité à l'attendu sont un préalable à l'interprétation des résultats obtenus sur les échantillons soumis à analyse.



6. Appareillage et matériels

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

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. Toutes les méthodes sont valables à condition de mettre en œuvre les moyens qui permettent d'éviter les risques de contaminations croisées.

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

Grandeur	EMT
Volume	Volume < 10 mL : EMT = $\pm 10\%$ Volume ≥ 10 mL : EMT = $\pm 5\%$
Masse	EMT = $\pm 10\%$
pH	EMT = $\pm 0,3$ unité pH
Température	Incubateur : EMT = $\pm 3^\circ\text{C}$ Réfrigérateur : 5°C et EMT = $\pm 4^\circ\text{C}$ Congélateur : $\leq -18^\circ\text{C}$ Congélateur froid intense : $\leq -65^\circ\text{C}$ Thermocycleur* : EMT justesse = $\pm 1^\circ\text{C}$; EMT homogénéité = $\pm 2^\circ\text{C}$
Temps	EMT = $\pm 10\%$

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

6.1 Broyeur

Cette méthode a été validée en utilisant un broyeur à billes (de type « Homex© » modèle 6 de Bioreba) avec broyage de l'échantillon dans un sachet de broyage en plastique, 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 point final

Le protocole a été évalué sur thermocycleur Veriti™ Thermal Cycler de Applied Biosystems et sur GeneAmp® PCR System9700 de Applied Biosystems. D'autres thermocycleurs permettant d'obtenir des résultats équivalents peuvent être utilisés.



7. Échantillons

7.1 Conditions d'acceptation des échantillons

Cas d'échantillons frais : le matériel végétal doit arriver au laboratoire dans un état de fraîcheur approprié (feuilles sans jaunissement, nécrose ou signe de sénescence). **Chaque prise d'essai est constituée au minimum de 0,5g de matériel végétal.**

Cas d'échantillons déshydratés : les échantillons doivent être complètement déshydratés. **La prise d'essai est constituée au minimum de 0,1g de feuille déshydratée.**

En cas d'échantillon réceptionné dans un état dégradé, le laboratoire émet des réserves sur tout résultat d'analyse négatif en précisant l'état dégradé de l'échantillon à la réception au laboratoire. Si les échantillons arrivent dans un état très 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.

En deçà de la quantité de matériel végétal nécessaire pour la prise d'essai, des réserves sont émises quant au résultat d'analyse si ce dernier est négatif.

7.2 Conservation des échantillons avant analyse

Le délai entre la réception de l'échantillon et le début de l'analyse doit être le plus court possible.

Pour les feuilles prélevées dans de bonnes conditions, le délai entre la réception des échantillons frais et le début de l'analyse doit être de préférence inférieur à 3 jours et ne doit pas dépasser 5 jours. En attente de l'analyse, les échantillons seront conservés à +5°C.

Si les échantillons ne peuvent être traités dans ce laps de temps, ils seront congelés à une température inférieure ou égale à -18°C, en attente de traitement (maximum 1 mois). Dans ce cas, la prise d'essai doit être effectuée, si possible, avant la congélation.

D'autres modes de conservation peuvent être envisagés : la lyophilisation, la dessiccation par la méthode de BOS (dessiccation en présence de chlorure de calcium). Ces modes de conservation peuvent avoir une incidence sur la charge virale des échantillons avec la possibilité d'induire des résultats faussement négatifs (échantillons faiblement contaminés détectés négatifs). Lorsque le laboratoire est contraint d'utiliser du matériel lyophilisé ou en BOS, le rapport d'analyse doit mentionner cette particularité : « Echantillon traité après conservation » (citer le mode de conservation).

7.3 Conservation des échantillons ou reliquats après analyse

Sauf mention contraire explicite ou impossibilité technique avérée, les laboratoires doivent conserver les reliquats pertinents (nature, quantité et qualité) de matériel soumis à analyse, dans des conditions appropriées garantissant leur intégrité, jusqu'à au moins le dixième jour ouvrable suivant l'envoi au demandeur d'un rapport d'analyse concluant à la non mise en évidence de l'organisme recherché. Ce délai imposé est destiné à laisser le temps au demandeur de l'analyse de contester le résultat auprès du laboratoire (ce qui prolonge la conservation du reliquat jusqu'à l'issue de la contestation) et éventuellement de demander une analyse contradictoire.



Dans le cas d'un résultat autre que la non mise en évidence de l'organisme recherché, l'ensemble des reliquats pertinents doit être conservé pendant une durée minimale de 12 mois, sauf pour les parties éventuellement transmises à un autre laboratoire agréé ou de référence, à qui est alors transférée la charge de conservation des reliquats. Le laboratoire national de référence peut demander que tout ou partie de ces reliquats lui soient transmis, aux frais des laboratoires agréés ou reconnus, dans le cadre des missions qui lui sont confiées.

8. Mode opératoire

8.1 Préparation des échantillons pour analyse

Divers auteurs rapportent que la distribution du BBTv au sein du bananier permet une détection du pathogène aussi bien sur feuilles (limbe et nervure centrale) que sur pétioles, pseudo-tronc, racines, rhizome et méristème. Toutefois, selon Wu et al. (1992), les plants infectés contiennent les plus fortes concentrations de BBTv dans les feuilles (limbe et nervure centrale), pétioles et gaines de la seconde feuille en partant du sommet.

Il est donc préférable de réaliser la prise d'essai sur feuilles jeunes (trois dernières feuilles complètement déployées) en incluant une partie de la nervure centrale.

La détection du CMV et du BBTv sur matériel végétal peut se faire à partir de la même prise d'essai.

Dans le cas où il y a des symptômes de nature à suspecter le BBTv (stries vert-foncé sur les nervures secondaires avec un faciès en crochet au niveau de la nervure principale, particulièrement visibles lorsqu'on regarde la face inférieure à contre-jour), la prise d'essai sera faite préférentiellement dans ces zones, toujours en essayant d'inclure une partie de la nervure centrale.

Pour les prises d'essai, l'opérateur veillera à prélever les tissus les mieux conservés (absence de signe de sénescence). Il opérera selon une procédure adaptée à son contexte (infrastructures, organisation) qui vise à éviter tout risque de confusion entre échantillons ou de contamination d'un échantillon par un autre.

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

Il peut être intéressant de préparer le même échantillon 2 fois dans l'éventualité d'une répétition du test (pour une confirmation par exemple).

1) Le traitement individuel des échantillons.

Pour le matériel frais, chaque prise d'essai est constituée au minimum de 0,5g et au maximum de 2,0g de matériel végétal.

Pour le matériel déshydraté (échantillons lyophilisés ou en BOS), la prise d'essai est constituée au minimum de 0,1g et au maximum de 0,5g de matériel végétal.



2) Cas particulier du regroupement des échantillons par lot.

Le regroupement par lot peut avoir des conséquences sur le seuil de détection 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).

Recommandations pour la prise d'analyse dans le cas d'un regroupement d'échantillons par 5.

Pour les échantillons frais, peser au moins 0.2g par échantillon soit un total d'au moins 1g pour un mélange de 5, en empilant par exemple les 5 feuilles les unes sur les autres et en découpant un morceau de chaque.

Pour les échantillons lyophilisés, peser au moins 0.1g par échantillon soit un total d'au moins 0.5g pour un mélange de 5.

Broyer l'échantillon selon le ratio poids/volume de 1/10, soit par exemple 1g de matériel végétal frais dans 9ml de tampon.

Il est important de prélever si possible une zone contenant en partie la nervure centrale afin d'éviter des problèmes d'hétérogénéité de la répartition du virus sur des échantillons très faiblement contaminés ou asymptomatiques.

8.2 Broyage de l'échantillon

Broyer le matériel végétal dans le tampon de broyage selon le ratio poids/volume de 1/10 soit 0,5g de matériel végétal frais pour 4,5mL de tampon, à l'aide d'un broyeur à billes, ou de toute autre méthode de broyage permettant d'obtenir des résultats équivalents.

Pour une prise d'essai sur feuilles déshydratées, le ratio préconisé est de 0,1g de matériel déshydraté pour 4,5mL de tampon.

Les broyats obtenus doivent être conservés à +5°C et utilisés le plus rapidement possible (au plus tard dans la journée).

Transférer le broyat dans des tubes de type Eppendorf en laissant environ 1 cm de vide pour une éventuelle congélation (à titre d'exemple, 1.5ml de broyat dans un tube de 2ml). Les tubes sont ensuite centrifugés à grande vitesse (à titre d'exemple 15 minutes à 13 000g) afin de culoter les particules virales (l'utilisation d'une centrifugeuse réfrigérée est recommandée). Retirer le surnageant. Ce culot peut soit être conservé à +5°C (pendant quelques heures), soit être conservé à une température inférieure ou égale à -18°C (pendant quelques jours) en attente de l'extraction ou être directement extrait.

A partir de cette étape, on peut commencer l'extraction de l'ADN.



8.3 Extraction d'ADN

Le kit initialement validé pour cette méthode est le DNeasy® Plant mini kit de Qiagen. L'ADN viral est extrait et purifié en suivant le protocole d'extraction Plant Tissue du fournisseur, en commençant par l'étape décrite dans le manuel, à savoir : « déposer 400µl de tampon AP1 et 4µl de RNase A dans chaque tube, bien homogénéiser ». Puis continuer les différentes étapes décrites.

L'éluion de l'ADN total se fait dans 100µl (à titre indicatif 2 x 50µl).

Les extraits d'ADN peuvent être conservés plusieurs semaines, à une température inférieure ou égale à -18°C, en attente de la réalisation de l'amplification.

8.4 Amplification – PCR

8.4.1 Préparation du mélange réactionnel

Séquences des amorces : confidentielles (Massé et al., à venir) ; contacter le LNR pour obtenir les séquences.

F BBTV Rep1

R BBTV Rep1

La taille des amplifiats générés est de 389 pb pour la cible BBTV et de 254pb pour le TIA.

Réactifs	[Solution-mère]	[Puits]	Volume pour un puits (µl)
Eau ultra pure			10,8
Tampon	5 X	1 X	5
MgCl ₂	25 mM	1,5 mM	1,5
dNTPs	10 mM	0,2 mM	0,5
Amorce F	10 µM	0,40 µM	1
Amorce R	10 µM	0,40 µM	1
Taq	5U/µl	1U/25µl	0,2
TIA (Optionnel)*	350fg/µl (Dilution à 10 ⁻⁶ dans notre cas)	28 fg/µl	2 (dans notre cas soit 700 fg)

*Contacter le LNR pour obtenir le TIA.



Remarques :

- Attention, le TIA étant de l'ADN, il doit être ajouté au mélange réactionnel dans un poste de travail différent que celui de la préparation du mélange réactionnel (par exemple le poste de travail de chargement des échantillons). La répartition du mélange réactionnel contenant le TIA ne sera donc pas réalisée dans le poste de travail habituel. **Si le TIA n'est pas utilisé rajouter 2µl d'eau au mélange réactionnel soit 12,8µl total.**

- Le volume final est de 25µl dans chaque puits soit 22µl de mélange réactionnel et 3µl d'ADN ou d'eau.

- Le protocole a été évalué avec le mélange réactionnel du kit Gotaq® Hot Start Polymerase de Promega. Cependant, ce réactif n'étant plus produit, le mélange réactionnel du kit Gotaq® G2 Hot Start Polymerase de Promega a été validé et peut être utilisé en remplacement. Dans ce kit, le tampon est disponible soit avec le tampon de charge déjà mélangé, soit sans le tampon de charge. La validation a été réalisée avec le tampon contenant le tampon de charge.

Programme d'amplification

Température (°C)		Durée	Cycles
T°C dénaturation initiale :	95	2 min	
T°C dénaturation. :	95	45 sec	35
T°C hybridation :	58	30 sec	
T°C élongation :	72	45 sec	
T°C élongation finale :	72	5 min	
T°C conservation :	12°C	∞	

Remarques :

Les temps indiqués sont dépendants de la Taq utilisée et il est nécessaire de suivre les recommandations du fournisseur en cas d'utilisation d'une Taq différente de celle utilisée pour la validation de la méthode.

8.4.2 Électrophorèse et Révélation

Déposer environ 10 µL de l'amplifiât, soit directement soit mélangé à du bleu de charge (environ 2µL pour 10µL d'amplifiât) selon le type de tampon utilisé précédemment (cf remarque § 5.3), sur un gel d'agarose à 1,5% (valeurs indicatives).

Un marqueur de taille, 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 concentration identique à celui utilisé pour réaliser le gel (à titre indicatif, 100 volts durant 1h.).

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

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

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

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.

Un résultat cible ou TIA est respectivement positif en présence d'un amplifiât de 389 pb ou de 254pb observé sur le gel et respectivement négatif en l'absence d'amplifiât de cette taille.

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

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

* : Optionnel

** : si le témoin positif est très fortement concentré, Il peut y avoir une concurrence entre la cible et le TIA qui sera alors peu ou pas visible. Cependant la cible est amplifiée validant ainsi la PCR



9.2 Calculs et expression des résultats

9.2.1 Détection AVEC TIA

Le test est négatif pour les échantillons ne présentant aucune bande à la taille attendue de la cible et présentant la bande d'amplification du TIA. Le test est positif pour les échantillons présentant une bande à la taille attendue (avec ou sans TIA).

Si aucun fragment n'est visible (TIA et cible), l'échantillon est considéré comme non validé : tester à nouveau l'échantillon en solution mère et également avec une dilution au 1/10^{ème} de l'extrait d'ADN.

Si l'amplification n'est pas améliorée, le résultat sera alors exprimé par une phrase du type « échantillon non analysable, présence d'inhibiteurs ».

Si les contrôles processus sont validés et que l'on détecte sur le gel une bande BBTv de très faible intensité, c'est-à-dire peu visible à l'œil nu d'un opérateur disposant d'une acuité visuelle considérée comme correcte, l'opérateur pourra réitérer le test de détection afin de confirmer son interprétation.

Les résultats s'interprètent de la manière suivante :

Analyse		Résultat de la cible	Résultat du TIA	Formulation
Puits 1	Puits 2			
+	+	POSITIF	POSITIF ou NEGATIF	Résultat positif pour la détection du BBTv
+	-	PCR à refaire. Si à nouveau au moins 1 positif sur 2, le résultat est interprété comme positif.	POSITIF ou NEGATIF	
-	-	NEGATIF	POSITIF	Résultat négatif pour la détection du BBTv

9.2.2 Détection SANS TIA

Le test est négatif pour les échantillons ne présentant aucune bande à la taille attendue de la cible. Le test est positif pour les échantillons présentant une bande à la taille attendue.

Si les contrôles processus sont validés et que l'on détecte une très faible bande BBTv peu visible sur gel, la décision sera à l'appréciation du Responsable technique de réitérer le test de détection.



Les résultats s'interprètent de la manière suivante :

Analyse		Résultat de la cible	Formulation
Puits 1	Puits 2		
+	+	POSITIF	Résultat positif pour la détection du BBTv
+	-	PCR à refaire. Si à nouveau au moins 1 positif sur 2, le résultat est interprété comme positif.	
-	-	NEGATIF	Résultat négatif pour la détection du BBTv



10. Caractéristiques de performance de la méthode

Les caractéristiques de performances de la méthode ont été évaluées par le LSV-RAPT (BBTV_2012) ;

Caractéristique	Paramètre	Valeur ou résultat obtenu lors de la caractérisation	Principales informations relatives aux modalités de réalisation de la caractérisation
Sensibilité	Pourcentage d'échantillons détectés parmi les échantillons cibles	99.4%	27 échantillons cibles, provenant de 7 pays différents avec des représentant du groupe Asie et pacifique sud, testés en triplicat avec 3 extractions puis 3 PCR : 3 plaques (3 puits/plaque).
Spécificité	Pourcentage d'échantillons non détectés parmi les échantillons non-cibles	100%	15 échantillons non-cibles, dont 5 sains (surtout génome B) et 10 infectés par d'autres pathogènes du bananier (bactérie, virus, champignon), testés en triplicat avec 3 extractions puis 3 PCR : 3 plaques (3 puits/plaque).
Exactitude	Pourcentage de vrais positifs et de vrais négatifs parmi des échantillons cibles et des échantillons non-cibles	99.6%	27 échantillons cibles testés en triplicat et 15 échantillons non-cibles testés en triplicat : 3 plaques (3 puits/plaque).
Seuil de détection	Niveau de concentration le plus bas pour lequel 100% des résultats sont positifs	1/1 000	20 échantillons cibles : (8 cibles du groupe Asie et 12 du groupes Pacifique sud) avec 9 niveaux de dilution par échantillon, 2 extractions et testés en duplicat : 2 plaques (2 puits/plaque).
Répétabilité	Pourcentage d'accords entre résultats interplaques pour les mêmes échantillons	100%	Les résultats obtenus pour la caractérisation du seuil de détection sont repris pour évaluer la répétabilité.
Reproductibilité	Pourcentage d'accords entre résultats pour les mêmes échantillons	100%	Essai bilatéral sur 3 gammes avec 8 niveaux de dilution en triplicat



Bibliographie

Hafner, G. J., R. M. Harding, and J. L. Dale. 1995. Movement and transmission of banana bunchy top virus DNA component one in bananas. *J. Gen. Virol.* **76**:2279-2285.

Karan, M., R. M. Harding, and J. L. Dale. 1994. Evidence for two groups of banana bunchy top virus isolates. *J. Gen. Virol.* **75 (Pt 12)**:3541-3546.

Thomas, J. E., and R. G. Dietzgen. 1991. Purification, characterization and serological detection of virus-like particles associated with banana bunchy top disease in Australia. *J. Gen. Virol.* **72**:217-224.

Wu, R. Y., and H. J. Su. 1992. Detection of BBTV in diseased and symptomless banana plants with monoclonal antibody. *Trop. Agric.* **69**:397-399.