

Méthode d'analyse en santé des végétaux

RÉFÉRENCE : ANSES/LSV/MA062- Version 3

Juillet 2023

Détection du virus de la rhizomanie Beet necrotic yellow vein virus (BNYVV) par RT-PCR en temps réel sur plantes hôtes

Laboratoire de la santé des végétaux

Laboratoire national de référence « Tous virus sauf virus sur bananier et plantes tropicales, virus de la Sharka (PPV), virus de la pomme de terre, virus sur agrumes et pepino mosaic virus sur semences vraies »

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*	/	Octobre 2020	Version initiale
v2	mineure	Janvier 2021	Restriction concernant les kits d'extraction validés (suppression d'une remarque page 17 de la version 1)
v3**	majeure	Juillet 2023	<p>Ajout d'un contrôle d'amplification interne en duplexage</p> <p>Modification du contrôle négatif de processus</p> <p>Changement des modalités de détermination de la valeur de cut-off pour la cible BNYVV</p> <p>Modifications relatives aux conditions de transport des reliquats de végétaux, de broyat et d'extrait d'ARN entre laboratoires</p>

* Cette méthode a fait l'objet d'une consultation du 10 juillet au 10 septembre 2020 sur le site internet de l'agence, notamment auprès des laboratoires agréés français.

** Cette méthode a fait l'objet d'une consultation du 18 avril au 18 mai 2023 sur le site internet de l'agence, notamment auprès des laboratoires agréés français.

Avant-propos

La présente méthode a été validée par :

Anses - Laboratoire de la santé des végétaux– Unité bactériologie, virologie et OGM

Laboratoire National de Référence : Mandat « Tous virus sauf virus sur bananier et plantes tropicales, virus de la Sharka (PPV), virus de la pomme de terre, virus sur agrumes et pepino mosaic virus sur semences vraies »

Adresse : 7 rue Jean Dixméras

49044 Angers CEDEX 01

Contact : lsv.ubvo@anses.fr

La présente méthode a été initialement optimisée, évaluée et validée par l'équipe de virologie de l'unité de bactériologie, virologie, détection d'OGM au sein du Laboratoire de la Santé des Végétaux (rapports de caractérisation et de validation de la méthode interne version 01 en date du mois de décembre 2015 et du mois d'août 2016, rapport d'essai inter-laboratoires de validation 16-RT-BNYVV version 01 en date du 17/02/2017, rapport de validation de l'utilisation du contrôle interne plante en date du mois de juillet 2023).

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

Sommaire

Avant-propos	3
Introduction	5
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 Kit d'extraction d'ARN	9
5.3 Oligonucléotides	9
5.4 Kit d'amplification de RT-PCR en temps réel	10
5.5 Autres réactifs et consommables à usage unique	10
5.6 Contrôles et témoins	10
6. Appareillage et matériels	11
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 des échantillons	16
8.3 Extraction de l'ARN total	16
8.4 Test de détection par RT-PCR en temps réel duplex	17
9 Résultats	18
9.1 Définition de la valeur de Cut off	18
9.2 Contrôle de la validité des résultats	19
9.3 Calculs et expression des résultats.....	19
10 Caractéristiques de performance de la méthode	20
Bibliographie	21

Introduction

Le Beet necrotic yellow vein virus (BNYVV) a été identifié comme le virus responsable de la maladie nommée « Rhizomanie » en référence à l'un des symptômes racinaires de la maladie, qui consiste en une prolifération du chevelu racinaire. (cf. photo 1 ci-dessous, source PM7/30(3) OEPP)



(Photo 1)

Les plantes hôtes de ce virus appartiennent principalement à la famille des *Chenopodiaceae* et à l'espèce *Beta vulgaris* (betteraves fourragère, potagère et sucrière ainsi que la poirée) mais aussi à l'espèce *Spinacia oleracea* (épinard).

Ce virus est transmis à la betterave par les zoospores d'un Plasmodiophoride du sol : *Polymyxa betae* (Protiste, parasite obligatoire des racelles).

Le BNYVV appartient au genre *Benyvirus* dont il est l'espèce type. C'est un virus constitué de 4 à 5 ARN simple brin positif de différentes tailles (6,7 ; 4,6 ; 1,8 ; 1,4 et 1,3 kb). Ces ARN sont encapsidés dans des particules non enveloppées en forme de bâtonnets de 60 nm à 390 nm de long et de 20 nm de diamètre (cf photo 2 ci-dessous, source PM7/30(3) OEPP).



(Photo 2)

Il existe actuellement 4 souches majoritaires non distinctes sérologiquement. Les deux souches principales, dénommées types A et B, possèdent 4 ARNsb. Les souches contenant l'ARN 5 ont été décrites en Europe et en Asie (historique présenté dans la revue publiée par Hleibieh *et al.*, en 2007). Ces dernières provoquent des symptômes plus sévères et une baisse de rendement importante (Harju *et al.* 2005).

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 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. 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.

La détention et/ou la manipulation de ce virus est soumise à l'obtention d'un arrêté préfectoral d'agrément en accord avec le nouveau règlement de santé végétale 2016/2031. Il est nécessaire que les installations de laboratoire permettent le contrôle des déchets solides, liquides afin de manipuler les échantillons végétaux dans le cadre de la détection du BNYVV.

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.

Tout fragment de matériel végétal (quel que soit son statut) doit être détruit par autoclavage ou autre moyen inactivant les virus, ainsi que tous les consommables avec lesquels ils ont été en contact.

Tout matériel utilisé lors du processus doit être désinfecté.

1. Objet et domaine d'application

L'objet de cette méthode est de détecter par RT-PCR en temps réel le BNYVV dans les racines ou feuilles de betteraves, d'épinards ou autres plantes hôtes.

Cette méthode est qualitative, elle permet de détecter la présence du BNYVV dans la limite du seuil de détection mais ne permet pas de quantifier la cible dans l'échantillon analysé, ni d'identifier la souche présente.

L'utilisation d'un couple d'amorces et d'une sonde marquée, dont la combinaison est spécifique du BNYVV (quelle que soit la souche considérée), permet de détecter et d'amplifier des portions discriminantes de l'ARN 2 codant pour la protéine de capsid de ce virus (fragment sur le gène P21 ; Harju *et al.*, 2005)

Un second couple d'amorces et une seconde sonde sont utilisés en tant que contrôle d'amplification interne. Ils permettent de vérifier que l'extraction s'est correctement déroulée et ainsi sécurisent les résultats d'analyse et plus particulièrement les résultats négatifs. Ce second couple d'amorces cible l'ARNm codant pour la sous-unité 5 de la NADH-déshydrogénase (Nad5) (Menzel *et al.*, 2002 et Botermans *et al.*, 2013).

2. Documents de référence

- 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.

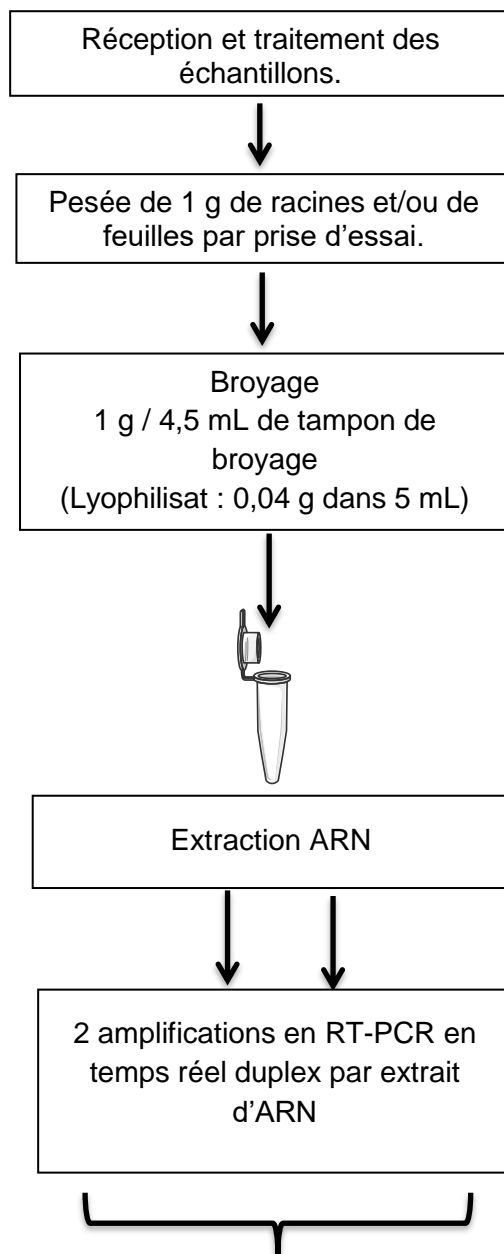
3. Termes, sigles et définitions

Afin de limiter les problèmes d'interprétation des termes employés, le vocabulaire utilisé dans les méthodes officielles du ministère chargé de l'agriculture est issu des normes, guides ou glossaires nationaux ou internationaux appropriés (AFNOR, ISO, CIPV, OEPP...).

Le glossaire GLO-001 reprend les principales définitions des termes employés dans cette méthode. L'attention des lecteurs est attirée sur le fait que les termes du glossaire ne sont pas repérés dans le texte de la méthode d'analyse.

4. Principe de la méthode

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



BNYVV détecté, non détecté ou indéterminé.

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, le manipulateur doit veiller (par l'utilisation de produits et consommables certifiés, par le nettoyage, par la stérilisation ou tout autre traitement approprié) à l'absence dans l'eau, produits et consommables utilisés, de contaminant (ARN), de nucléase, d'inhibiteur ou de tout autre élément pouvant influencer sur le résultat.

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

5.1 Eau

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

5.2 Kit d'extraction d'ARN

L'ARN total des prises d'essai analysées est extrait et purifié à l'aide d'un kit d'extraction d'ARN de plante disponible dans le commerce. Le kit d'extraction validé par le LNR pour cette méthode est le kit RNeasy® Plant Mini Kit (Qiagen© ref 74904 50 preps). Celui-ci est utilisé selon une adaptation du mode opératoire du fournisseur, tel que décrit au point 8.3 (rapports de caractérisation et de validation « méthode interne » en date du mois de décembre 2015 et d'août 2016 et rapport d'essai interlaboratoires de validation 16-RT-BNYVV en date du 17/02/2017).

5.3 Oligonucléotides

Les séquences (5' - 3') des amorces et de la sonde du test spécifique sont les suivantes :

- BNYVV-CP 26F * : 5' - CATGGAAGGATATGTCTCATAATAGGTT - 3'
- BNYVV-CP 96R * : 5' - AACACTCACGACGTCCGAAAC - 3'
- BNYVV-CP 56T * : [6-FAM] - 5' - TGACCGATCGATGGGCCCG - 3' - [BHQ1]

* Harju *et al.*, 2005.

Les séquences (5' - 3') des amorces et de la sonde du test employées en contrôle interne sont les suivantes :

- nad5-F **: 5' - GAT GCT TCT TGG GGC TTC TTG TT - 3'
- nad5-R **: 5' - CTC CAG TCA CCA ACA TTG GCA TAA - 3'
- nad5-P *** [Cy5] - 5' - AGG ATC CGC ATA GCC CTC GAT TTA TGT G - 3' - [BHQ2]

** Menzel *et al.*, 2002 ; *** Botermans *et al.*, 2013

Les amorces doivent être au minimum de qualité RP cartridge et la sonde de qualité HPLC (exemples des critères de qualité du fournisseur Eurogentec). Dans le cas où d'autres fournisseurs proposent des critères de qualité différents, le laboratoire doit s'assurer de l'équivalence du niveau de performance.

Les fluorophores utilisés pour chaque sonde peuvent être modifiés, sous réserve que pour chaque sonde le fluorophore extincteur associé soit adapté au rapporteur associé, que d'une sonde à l'autre les fluorophores rapporteurs soient différents et que l'appareil de PCR en temps réel employé permette de les lire séparément.

5.4 Kit d'amplification de RT-PCR en temps réel

Le kit validé par le Laboratoire National de Référence (LNR) pour cette méthode est le Kit AgPath-ID™ One-Step RT-PCR Kit de chez Applied Biosystems™ (référence catalogue ThermoFisher Scientific février 2023 n° AM10005, n°4387424 ou n° 4387391, pour 100, 500 ou 1000 réactions respectivement), avec utilisation de la référence passive ROX.

5.5 Autres réactifs et consommables à usage unique

- Ethanol 96%vol
- Coupelles de pesée ou autre système de pesée adapté ;
- Sacs de broyage avec gaze de filtration à mailles en nylon à usage unique;
- Cônes à filtre pour pipettes de volumes adaptés (plage 0,5 µL à 5 mL) ;
- Microtubes stériles de 1,5 mL ou 2 mL en fonction des étapes des protocoles ;
- Microtubes ou capillaires (qualité biologie moléculaire) de volume adapté au thermocycleur temps réel utilisé, à paroi fine, en barrette de 4 ou 8 puits ou en plaque de 96 puits.
- Produits courants de désinfection d'un laboratoire de microbiologie et de biologie moléculaire

5.6 Contrôles et témoins

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

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

Les contrôles et témoins à produire permettant de garantir la fiabilité des résultats au cours de l'analyse sont *a minima* les suivants :

- Un contrôle positif de processus : il devra contenir l'organisme cible. Il subira toutes les phases de l'analyse à partir de la phase d'extraction. Il est composé d'un échantillon défini comme positif BNYVV. Il permet de contrôler la qualité et le bon fonctionnement de l'extraction et de mettre en évidence d'éventuelles inhibitions. Il sera testé lors de chaque série d'extraction pour vérifier que la cible BNYVV a bien été extraite lors de la phase d'extraction d'ARN.
- Un contrôle négatif de processus : il sera préparé pour chaque série d'extractions. Il est composé du tampon d'extraction. Ce contrôle subira toutes les phases de l'analyse dès l'étape de préparation de l'échantillon. Il sera testé lors de chaque série d'extraction pour vérifier l'absence de contamination croisée entre échantillons ou de contamination externe lors de la phase d'extraction d'ARN.

- Un contrôle positif de RT-PCR (ou témoin positif d'amplification) sera systématiquement introduit lors de chaque réaction de RT-PCR en temps réel. Il est composé d'un extrait d'ARN positif au BNYVV afin de vérifier la qualité de l'amplification ainsi que la qualité de la manipulation et le bon fonctionnement du matériel.
- Un contrôle négatif de RT-PCR (ou témoin négatif d'amplification) sera systématiquement introduit lors de chaque réaction de RT-PCR en temps réel. Il est composé d'une prise d'échantillon du mélange réactionnel préparé ou d'eau ultra-pure ayant servi à la composition du mélange réactionnel. Il subira toutes les phases de l'analyse à partir de la préparation du mélange réactionnel de PCR pour vérifier l'absence de contamination lors de cette phase.
- Un contrôle d'amplification interne est intégré afin de vérifier la qualité de l'extraction d'acides nucléiques, le bon dépôt de ces extraits ainsi que l'absence d'inhibition. Il prend la forme d'un test RT-PCR temps réel utilisant la combinaison d'amorces / sonde Nad 5 -F/-R/-P (Menzel *et al.* 2002 et Botermans *et al.*, 2013). Ce test est réalisé dans le même tube réactionnel que le test de détection de BNYVV. Ce test permet de générer un signal de fluorescence de nature exponentielle significativement supérieur au bruit de fond si des acides nucléiques de plante sont présents dans un extrait, sans effet inhibiteur suffisant.

Ces témoins sont ensuite amplifiés comme les autres échantillons, cependant la duplication des dépôts d'ARN n'est pas requise pour les contrôles.

Ces contrôles ainsi que des contrôles supplémentaires que le laboratoire peut ajouter si nécessaire sont définis dans la MOA022.

En cas d'anomalie constatée sur un contrôle, les dispositions de la MOA022 doivent être respectées.

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. Ces informations sont données à l'intention des utilisateurs de la méthode et ne signifient nullement que l'Anses recommande l'emploi exclusif de ces matériels. Des matériels équivalents peuvent être utilisés s'il est démontré qu'ils conduisent aux mêmes résultats.

L'agencement et l'équipement des zones de travail sont définis dans la MOA022 version en vigueur.

Les matériels utilisés dans la méthode doivent satisfaire aux exigences de la MOA022 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 1 ci-après (dans le cas contraire, des spécifications sont précisées dans le texte de la méthode).

Tableau 1 : Erreurs maximales tolérées

Grandeur	EMT
Volume	EMT définies par la MOA022 version en vigueur ou par la norme NF EN ISO 8655-2
Masse	EMT = $\pm 10\%$
Température	Thermobloc, bain à sec : EMT = $\pm 5^{\circ}\text{C}$ Réfrigérateur : 5°C et EMT = $\pm 4^{\circ}\text{C}$ (ou plus strict en fonction des recommandations fournisseur) Congélateur : $\leq -18^{\circ}\text{C}$ en fonction de l'usage

Thermocycleur : le constat de qualification (aptitude à l'usage attendu) se fera sur la base des résultats obtenus par le biais d'un test biologique ou d'une vérification métrologique.

En plus de l'appareillage courant, le matériel suivant est jugé nécessaire pour certaines phases de l'analyse :

Préparation des échantillons

- Balance de portée et d'exactitude adaptées à la pesée des échantillons (ex : balance de classe II) ;
- Pipette automatique (plage de mesure de 1 à 5 mL) et/ou distributeur ;
- Broyeur à billes (ou autre système de broyage pourvu qu'il permette d'obtenir une qualité de broyage équivalente et limite les risques de contaminations) ;
- Petits équipements de laboratoire : ciseaux, pinces, scalpel, sécateur.

Extraction des ARN

- Agitateur de tubes de type Vortex ;
- Centrifugeuse permettant d'atteindre *a minima* une force centrifuge relative d'environ 8000 g et un rotor adapté pouvant recevoir des tubes plastiques de 1,5 et 2 mL ;
- Centrifugeuse de paillasse type « microspin » ;
- Pipettes automatiques (plage de mesure de 0,5 μL à 5 mL) ;
- Epruvette graduée de 50 mL ;
- Thermobloc ou bain-à-sec (température = 56°C) (pour la lyse cellulaire) ou enceinte thermostatique (température 56°C).

Amplification des ARN

- Pipettes automatiques (plage de mesure de 0,5 μL à 1 mL) ;
- Appareil de PCR en temps réel, jeu de filtres adaptés et logiciel associé (méthode validée à l'aide de l'appareil ARIA MX Pro d' Agilent Technologies piloté par le logiciel version 1.4).

Stockage des échantillons et des ARN

- Congélateur;
- Réfrigérateur.

7. Échantillons

7.1 Conditions d'acceptation des échantillons

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

- Les échantillons reçus pour analyse doivent être dans un bon état de conservation, c'est-à-dire, ni desséchés, ni nécrosés ni en cours de décomposition. Le temps entre le prélèvement et l'arrivée au laboratoire doit être le plus réduit possible. Si les échantillons ne sont pas envoyés le jour même, ils doivent être conservés au froid avant l'envoi.
- Chaque échantillon est conditionné individuellement dans un emballage hermétique et parfaitement identifié (référence figurant sur la fiche de demande d'analyse). Toutes les mesures doivent être prises pour conserver l'intégrité de l'échantillon et éviter les contaminations par d'autres échantillons. Pour les échantillons lyophilisés ou déshydratés, ils doivent être complètement déshydratés et ne pas présenter de développement de moisissures.
- Taille de l'échantillon suffisante pour réaliser les prises d'essai nécessaires.
- Présence d'une fiche de demande d'analyse unique par échantillon : formulation claire de la demande, identification du végétal, de l'expéditeur, référence des échantillons. Ces éléments sont fixés à l'extérieur du colis.
- Dans le cas d'une demande de confirmation auprès du LNR, copie du rapport du laboratoire agréé.

Dans le cas contraire, le laboratoire contacte le client dans les plus brefs délais et se réserve le droit de refuser la demande d'analyse en explicitant les raisons de ce refus.

7.2 Conservation des échantillons avant analyse

Pour les échantillons prélevés dans de bonnes conditions, le délai entre la réception des échantillons et le début effectif de l'analyse doit être de préférence inférieur à 3 jours sans dépasser 5 jours. En attente de l'analyse, les échantillons sont 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.

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.

Cas d'un échantillon négatif : au minimum jusqu'au quinzième jour ouvrable suivant l'envoi au demandeur d'un rapport d'analyse pour éventuellement permettre la demande d'une analyse contradictoire par le client.

Cas d'un échantillon positif ou indéterminé : pour une durée minimale de 12 mois, sauf pour les parties éventuellement transmises à un laboratoire agréé ou de référence, à qui est alors transférée la charge de conservation des reliquats (échantillon, broyat et extrait d'ARN).

Les conditions de conservation des différents types de reliquats d'échantillon à conserver en vue d'éventuelles analyses complémentaires sont présentées dans le tableau 2 ci-après :

Tableau 2 : conditions de conservation des échantillons après analyse.

Etapas	Type de reliquat	Conservation		Modalités d'envoi à un autre laboratoire le cas échéant
		Durée	Conditions	
Echantillon	Feuilles, racines/ Plants racinés	Résultat négatif : 15 jours après envoi du rapport	+5°C	Sachets individuels fermés et clairement identifiés Température ambiante ou conditions réfrigérées (froid positif) Transporteur rapide
		Résultat autre que négatif: 12 mois	+5°C jusqu'à obtention du résultat (ou jusqu'à envoi au LNR) puis ≤-18°C	
Broyage	Broyat végétal	Résultat négatif : 15 jours après envoi du rapport	≤-18°C	Sachets / Tubes / pots fermés hermétiquement et clairement identifiés Température ambiante ou conditions réfrigérées (froid positif ou négatif) Transporteur rapide
		Résultat autre que négatif: 12 mois		
Extraction d'ARN	Extraits d'ARN	Résultat négatif : 15 jours après envoi du rapport	≤-18°C	Tubes hermétiques clairement identifiés Température ambiante ou conditions réfrigérées (froid positif ou négatif) Transporteur rapide
		Résultat autre que négatif: 12 mois		

8. Mode opératoire

Le laboratoire doit avoir des dispositions adaptées à son environnement (locaux, infrastructures, ...) visant à éviter tout risque de confusion entre échantillons et tout risque de contamination d'un échantillon par un autre.

8.1 Préparation des échantillons pour analyse

Les échantillons sont à manipuler avec des gants (désinfecter les gants avec une solution d'hypochlorite de sodium ou produit ayant une action équivalente, ou les remplacer, entre chaque échantillon).

La prise d'essai peut être constituée de :

- Radicelles et racines, épiderme du pivot racinaire
- Feuilles
- Tiges.

Pour la pesée des prises d'essai, les intervalles de pesée présentés dans le tableau 3 ci-après doivent être appliqués (règle des 5%) :

Exemple :

Tableau 3 : intervalles de pesée

Masse minimale	Masse cible	Masse maximale
0,95 g ≤	1,0 g	< 1,05 g

Analyse à partir d'échantillons obtenus par piégeage sur terre, eau terreuse ou décantée :

La prise d'essai peut être composée d'un mélange de tige et/ou de racelles. 1 g de matériel végétal est prélevé par prise d'essai. Ces tiges et racelles proviennent de plantules ayant servi au piégeage (cf. MA061) et dont l'appareil racinaire a été lavé.

Dans ce cas, chaque échantillon est constitué de 5 prises d'essai (correspondant à 5 pots de culture parmi les 6).

Analyse à partir d'échantillons prélevés en zones protégées :

- Un échantillon est constitué d'un prélèvement de 15 ou 30 plantes entières disposant d'un appareil racinaire le plus préservé possible.
- Après avoir lavé, nettoyé puis séché le système racinaire des plantes à l'eau courante et avec du papier absorbant, les répartir en 5 ou 10 lots de 3 plantes. Pour chaque lot, prélever sur chacune des plantes les racelles, ou à défaut de l'épiderme de la racine, afin de préparer 2 fractions de 1 g par lot constituant pour l'une la prise d'essai qui doit être traitée le jour même et pour l'autre, la prise d'essai qui sera conservée en tant que reliquat (cf. §7.3). Une attention particulière sera portée pour obtenir la meilleure homogénéité possible entre les lots.

Analyse pour autres échantillons :

- 1 g en matériel frais est prélevé. Si le matériel est déshydraté ou lyophilisé, la pesée correspondante à un gramme de matériel frais est de 0,04 g.
- Une deuxième prise d'essai équivalente à la première doit également être préparée et gardée au congélateur (matériel frais) ou au réfrigérateur (matériel déshydraté) en tant que reliquat.

Remarque : Si la prise d'essai n'atteint pas 1 g, le ratio poids/tampon de broyage sera adapté. Si ce poids est inférieur à 0,5 g et si le résultat est négatif, une réserve sur le résultat sera émise sur le rapport d'analyse.

Entre chaque échantillon, les coupelles de pesée sont changées, et la pailasse est nettoyée avec de l'hypochlorite de sodium ou un produit ayant une action similaire afin d'éviter les contaminations croisées (destruction des traces d'ARN). Le petit matériel (scalpels, ciseaux, etc.) est désinfecté avec une solution d'hypochlorite de sodium d'une concentration d'au moins 2,6 % de chlore actif puis rincé abondamment à l'eau déminéralisée (élimination des traces d'ARN).

La prise d'essai est déposée dans un sac de broyage en plastique (avec gaze pour la filtration des particules grossières).

8.2 Broyage des échantillons

Broyer 1 g de matériel végétal frais ou 0,04 g de matériel déshydraté dans respectivement 4,5 ou 5,0mL de tampon RLT (Qiagen référence février 2023 n°79216) dans un sachet de broyage adapté et référencé (type Bioreba) à l'aide d'un broyeur à billes ou de toute autre méthode de broyage permettant d'obtenir des résultats équivalents. Introduire à ce stade un contrôle de processus positif et un contrôle de processus négatif tels que décrits au point 5.6.

Les broyats obtenus doivent être conservés au réfrigérateur et utilisés le plus rapidement possible (au plus tard dans la journée).

Après utilisation, les broyats peuvent être conservés au congélateur pour des besoins ultérieurs. Pour éviter toute contamination croisée potentielle, toutes les mesures de destruction des ARN doivent être prises entre chaque manipulation d'échantillons.

8.3 Extraction de l'ARN total

Ce protocole est adapté du protocole du fournisseur (Qiagen©) pour le kit RNeasy® Plant Mini Kit (Qiagen référence février 2023 n°74904).

- Allumer et programmer la centrifugeuse à température ambiante et selon les recommandations ci-dessous,
- Mettre en chauffe le thermobloc ou le bain-à-sec à 56°C.
- Référencer tous les microtubes et colonnes nécessaires à la série d'extraction.
- Après avoir homogénéisé par massage avec les doigts les sachets contenant le broyat végétal, transférer 450 µL du broyat de chaque prise d'essai dans un microtube préalablement référencé de 1,5 mL.
- Incuber ces microtubes 3 minutes à 56°C dans le thermobloc ou bain à sec.
- Transférer le contenu de chaque microtube dans une colonne QIAshredder (violet) précédemment référencée et posée sur microtube de 2mL.
- Centrifuger 2 minutes à vitesse maximum.
- Transférer l'éluât sans le culot dans un microtube de 2mL contenant 200 µL d'éthanol à 96%vol.
- Homogénéiser immédiatement par un aller-retour de pipetage.
- Transférer le tout (min 600 µL) sur une colonne Rneasy (rose) placée sur un microtube sans bouchon de 2 mL.
- Centrifuger 1 minute à une vitesse \geq à 8000 g.
- Jeter l'éluât, ajouter 700 µL de tampon « RW1 » dans chaque colonne et centrifuger 1 minute à une vitesse \geq à 8000 g.
- Jeter l'éluât, ajouter 500 µL de tampon « RPE » dans chaque colonne et centrifuger 1 minute à une vitesse \geq à 8000 g.
- Jeter l'éluât, ajouter 500 µL de tampon « RPE » dans chaque colonne et centrifuger 2 minutes à une vitesse \geq à 8000 g.

- Jeter l'éluât et le tube sans bouchon puis placer chaque colonne Rneasy (rose) sur une nouvelle série codée de microtubes de 1,5 mL
- Ajouter 50 µL d'eau RNase free au centre de chaque colonne et attendre environ 5 minutes.
- Centrifuger 1 minute à une vitesse \geq à 8000 g pour éluer l'ARN.
- Jeter la colonne Rneasy (rose).

Les extraits d'ARN peuvent être utilisés directement pour réaliser la RT-PCR ou ils peuvent être stockés à $\leq -18^{\circ}\text{C}$ pour une conservation de quelques mois.

Remarque : au cours des étapes de lavages avec les tampons RW1 et RPE, il est possible de changer les séries de microtubes de 2 mL sans bouchon afin de limiter toutes contaminations éventuelles.

8.4 Test de détection par RT-PCR en temps réel duplex

Pour chaque extrait d'ARN, deux amplifications doivent être réalisées. **Ne pas vortexer les extraits d'ARN car ils sont fragiles et éviter les cycles successifs de congélation/décongélation.**

Pour chaque série d'amplification, insérer un témoin négatif d'amplification et un témoin positif d'amplification tel que décrit au point 5.6.

La composition du mélange réactionnel pour une réaction est présentée dans le tableau 4 ci-après:

Tableau 4 : composition du mélange réactionnel

Réactifs	Concentration finale
Eau ultra pure	qsp 24 µL
RT-PCR Buffer : AgPath-ID™ One-Step RT-PCR Kit	1 X
RT-PCR Enzyme mix AgPath-ID™ One-Step RT-PCR Kit	1 X
Amorce sens BNYVV-CP 26F	0,3 µM
Amorce antisens BNYVV-CP 96R	0,3 µM
Sonde BNYVV-CP 56T	0,1 µM
Amorce sens nad5-F	0,3 µM
Amorce antisens nad5-R	0,3 µM
Sonde nad5-P	0,1 µM
Mélange réactionnel	24 µL
Extrait d'ARN	1 µL
Volume final	25 µL

Les différents paramètres de l'amplification par RT-PCR en temps réel pour la détection du *BNYVV* sont présentés dans le tableau 5 ci-après:

Tableau 5 : paramètres d'amplification

Etape	Température	Durée programmée	Nombre de cycle
Transcription inverse de l'ARN en ADN	45°C	30 min	1
Activation de l'ADN polymérase	95°C	10 min	
Dénaturation	95°C	15 s	40
Hybridation / Elongation (mesure de la fluorescence à la fin de chaque cycle)	60°C	1min	

9 Résultats

9.1 Définition de la valeur de Cut off

Afin d'éviter la prise en compte de potentiels signaux tardifs aspécifiques, il a été décidé d'intégrer un « cut-off » ou « Cycle threshold limit » au-delà duquel la garantie de déclarer un échantillon positif n'est plus assurée de façon répétable.

Valeur de Cut-off pour la cible BNYVV:

Il appartient à chaque laboratoire de déterminer sa propre valeur de cut-off pour la cible BNYVV. Celle-ci pourra être différente pour chaque thermocycleur employé et devra être recalculée en cas de changement ou de réparation de matériel. Dans le cadre des analyses officielles, le calcul sera réalisé avec l'appui du laboratoire de référence.

Il est recommandé de calculer la valeur de cut-off à partir des valeurs de Ct obtenues à partir d'un témoin positif dilué dans un témoin sain sur une gamme minimum de 6 dilutions et sur 6 répétitions. Réaliser ensuite une régression logarithmique entre le log 10 des dilutions et les écarts-types calculés à partir des 6 valeurs de Ct obtenues à chaque niveau. Calculer la valeur de Ct au-delà de laquelle, les données sont jugées non répétables (écart type supérieur à 0,5). Considérer comme valeur de cut-off cette valeur + 0,5, arrondie à l'entier supérieur.

Valeur de Cut-off pour la cible Nad 5:

Dans le cadre de la validation réalisée par le LNR, la valeur de cut-off pour la cible Nad 5 a été établie à 30 Ct.

9.2 Contrôle de la validité des résultats

Une valeur de Ct doit être accompagnée d'une courbe de type exponentiel (en échelle linéaire et exponentielle) pour être prise en compte.

Pour la détermination de la ligne de seuil (threshold), il est recommandé d'utiliser la détermination automatique réalisée avec le logiciel du thermocycleur.

La validation de l'analyse s'effectue en observant les courbes de fluorescence mesurées par l'appareil de PCR en temps réel pour les différents témoins.

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

- Pour la cible BNYVV, le contrôle négatif de processus et le témoin négatif d'amplification n'ont pas généré de courbe de fluorescence de type exponentiel, ni de valeur de Ct, ou bien une valeur de Ct > à la valeur de cut-off. Ils permettent de vérifier l'absence de contamination croisée accidentelle.
- Pour la cible BNYVV, le contrôle positif de processus et le témoin positif d'amplification ont généré une courbe de fluorescence de type exponentiel et une valeur de Ct ≤ à la valeur de cut-off. Le contrôle positif de processus permet de vérifier le bon déroulement de l'extraction. Le témoin positif d'amplification permet de vérifier la qualité des réactifs PCR et les paramètres d'amplification.
- Pour la cible Nad 5, le contrôle positif de processus et le témoin positif d'amplification ont généré une courbe de fluorescence de type exponentiel et une valeur de Ct ≤ à 30. Le contrôle négatif de processus n'a pas généré de courbe de type exponentiel, ni de valeur de Ct, ou bien une valeur de Ct >30.

Dans le cas où une ou plusieurs conditions ne seraient pas respectées, l'analyse n'est pas validée.

9.3 Calculs et expression des résultats

Si la série d'analyse est validée, les résultats peuvent être considérés comme interprétables.

Les règles d'interprétation pour chaque prise d'essai sont présentées dans le tableau 6 ci-après :

Tableau 6 : règles d'interprétation applicables

Amplification BNYVV	Amplification Nad 5	
	Ct ≤ 30	Ct > 30
Ct ≤ valeur de cut-off définie sur au moins 1 puits sur 2	Positif	Positif
Ct > valeur de cut-off définie pour les 2 puits	Négatif	Extraction à renouveler et interprétation selon les mêmes critères Si cette situation se renouvelle : Indéterminé

Pour les échantillons divisés en plusieurs prises d'essai :

- Si une seule prise d'essai est positive, l'échantillon est déclaré positif.
- Si toutes les prises d'essai sont négatives, l'échantillon est déclaré négatif.
- Si au moins une prise d'essai est déclarée indéterminée et les autres négatives, l'échantillon est déclaré indéterminé.

Expression des résultats sur le rapport d'analyse :

Le résultat final du test est exprimé sous forme qualitative : « négatif/positif/indéterminé », « détecté/non détecté/indéterminé » ou mention équivalente.

10 Caractéristiques de performance de la méthode

La synthèse des caractéristiques de performances de la méthode présentée dans le tableau n°6 ci-après est extraite du rapport de l'essai inter laboratoire de validation réalisé en 2016 et établi par le LNR le 17/02/2017.

Tableau 7 : valeurs des critères de performance obtenues lors de la validation de la MA062v1 réalisée en 2015, de l'EILV réalisé en 2016 et de la validation de la MA062 v3 réalisée en 2022.

Critères de performance	Valeur ou résultat obtenu lors de la caractérisation	Principales informations relatives aux modalités de réalisation de la caractérisation
Sensibilité	98% *	12 isolats de BNYVV représentatifs des souches A, B et P sur racines et feuilles de différentes espèces hôtes (<i>Beta vulgaris</i> , <i>Chenopodium quinoa</i> , <i>Nicotiana benthamiana</i>), répétés 3 fois
Spécificité	98% *	12 échantillons non cibles répétés 3 fois : Betterave fourragère, potagère et sucrière, poirée, épinard, TRSV, BBSV, BMV, BYV, BSBV, SBWMV, PMTV
Répétabilité	95% *	Calcul sur la base des données de sensibilité et de spécificité
Exactitude	98% *	
Reproductibilité	95% *	Analyse par 8 laboratoires de 10 échantillons répétés 2 fois
Sensibilité analytique	1/10000 **	Gamme de 5 dilutions répétées 6 fois

* Valeurs obtenues lors de la validation de la MA062 v1

** Valeur obtenue lors de la validation de la MA062 v3

Bibliographie

- Botermans, M., Van de Vossenbergh, B. T. L. H., Verhoeven, J. T. J., Roenhorst, J. W., Hooftman, M., Dekter, R., & Meeke, E. T. M. (2013). Development and validation of a real-time RT-PCR assay for generic detection of potyviruses. *Journal of virological methods*, 187(1), 43-50.
- Harju, V. A., Skelton, A., Clover, G. R. G., Ratti, C., Boonham, N., Henry, C. M., & Mumford, R. A. (2005). The use of real-time RT-PCR (TaqMan®) and post-ELISA virus release for the detection of Beet necrotic yellow vein virus types containing RNA 5 and its comparison with conventional RT-PCR. *Journal of Virological Methods*, 123(1), 73-80.
- Hleibieh, K., Peltier, C., Klein, E., Schirmer, A., Schmidlin, L., Covelli, L., ... & Gilmer, D. (2007). Étiologie de la rhizomanie de la betterave sucrière. *Virologie*, 11(6), 409-421.
- Menzel, W., Jelkmann, W., & Maiss, E. (2002). Detection of four apple viruses by multiplex RT-PCR assays with coamplification of plant mRNA as internal control. *Journal of Virological Methods*, 99(1-2), 81-92.
- MA061 version 1 : Détection du virus de la rhizomanie Beet necrotic yellow vein virus (BNYVV) de la Betterave : Test biologique.
- Rapport de caractérisation et de validation « méthode interne » en date du mois de décembre 2015.
- Rapport de caractérisation et de validation « méthode interne » en date du mois d'août 2016.
- Rapport d'essai interlaboratoires de validation 16-RT-BNYVV en date 17/02/2017.
- Rapport de Validation d'une méthode de détection du BNYVV incluant un contrôle interne plante par RT-PCR en temps réel en date du mois de février 2023.