

2015-2016

DUT Génie Biologique

Option Analyses Biologiques et Biochimiques

# Evaluation des méthodes de détection de *Spiroplasma citri* par amplification génique

Morgane Plaire

Maître de stage : Mme Marianne Loiseau

Tuteur pédagogique : Mme Delphine Goven



Anses  
Laboratoire de la santé des végétaux  
Unité bactériologie, virologie et OGM (Angers)  
Equipe : Virologie-Phytoplasmologie

Soutenu publiquement le :  
30 juin 2016



**L'auteur du présent document vous autorise à le partager, reproduire, distribuer et communiquer selon les conditions suivantes :**



- Vous devez le citer en l'attribuant de la manière indiquée par l'auteur (mais pas d'une manière qui suggérerait qu'il approuve votre utilisation de l'œuvre).
- Vous n'avez pas le droit d'utiliser ce document à des fins commerciales.
- Vous n'avez pas le droit de le modifier, de le transformer ou de l'adapter.

**Consulter la licence creative commons complète en français :**  
<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/2.0/fr/>

Ces conditions d'utilisation (attribution, pas d'utilisation commerciale, pas de modification) sont symbolisées par les icônes positionnées en pied de page.



# REMERCIEMENTS

Je tiens tout d'abord à remercier Madame Loiseau Marianne, mon maître de stage et adjointe au responsable d'équipe virologie-phytoplasmologie pour m'avoir fait confiance et m'avoir acceptée en tant que stagiaire dans son équipe. Je la remercie également pour l'aide qu'elle m'a apportée tout au long de mon stage et pour la relecture de mon rapport.

Merci à Madame Renaudin Isabelle et Madame Cousseau-Suchard Pascaline, techniciennes de l'équipe virologie-phytoplasmologie pour la formation aux travaux de laboratoire qu'elles m'ont dispensé et leurs réponses à mes questions.

Merci à Madame Goven Delphine, mon tuteur pédagogique pour son suivi et sa visite au laboratoire de la santé des végétaux.

Enfin merci à l'ensemble des membres du laboratoire de la santé des végétaux pour leur accueil et leur bonne humeur.

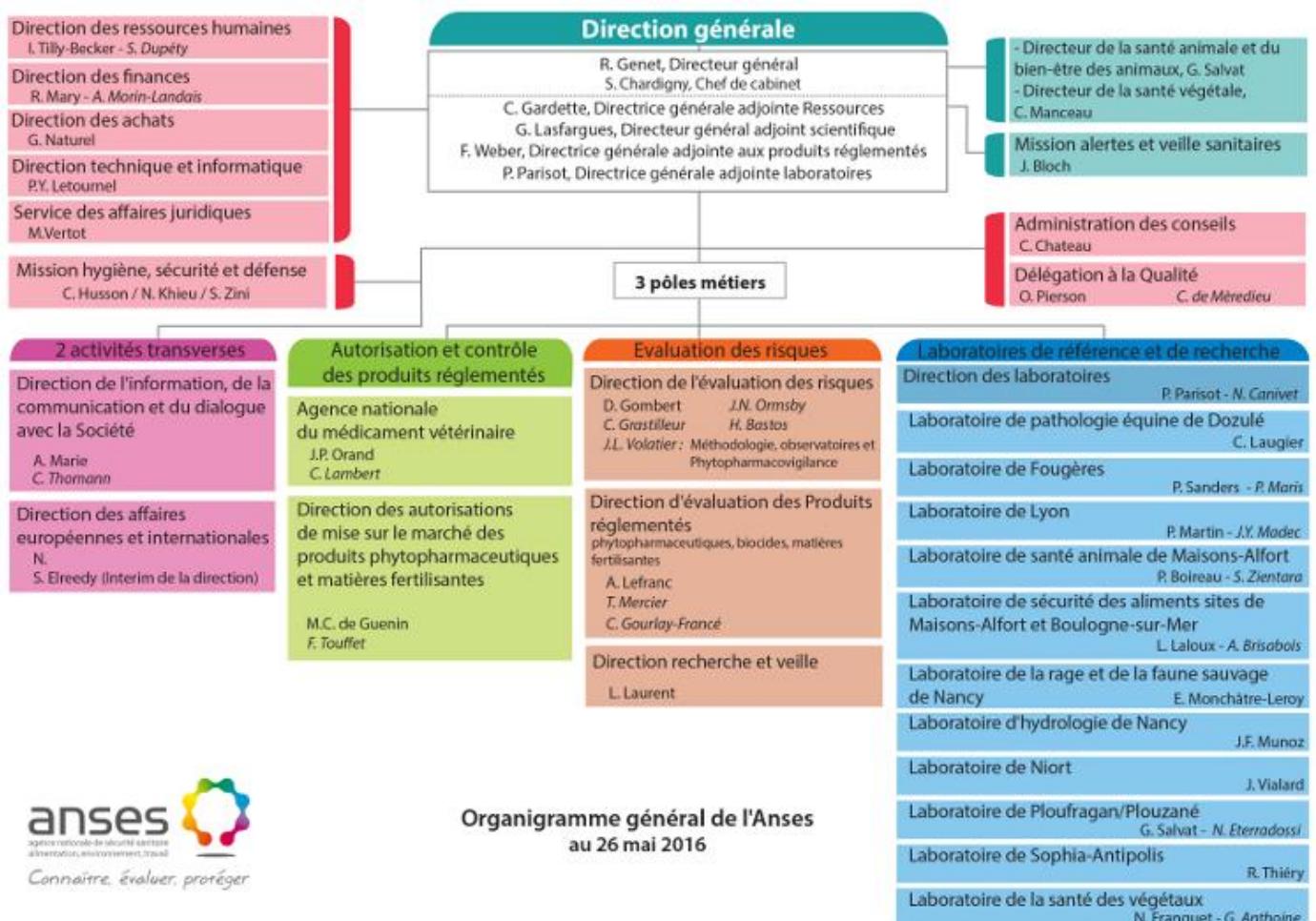
# Table des matières

<b>PRESENTATION DE LA STRUCTURE.....</b>	<b>1</b>
<b>INTRODUCTION .....</b>	<b>3</b>
<b>MATERIELS ET METHODES .....</b>	<b>6</b>
<b>1. Echantillons d'ADN .....</b>	<b>6</b>
<b>2. Extraction des acides nucléiques .....</b>	<b>7</b>
<b>3. PCR conventionnelle .....</b>	<b>8</b>
3.1. Principe .....	8
3.2. Méthodes utilisées.....	9
<b>4. PCR en temps réel.....</b>	<b>10</b>
4.1. Principe .....	10
4.2. Méthodes utilisées.....	12
<b>5. Méthodologie de caractérisation.....</b>	<b>13</b>
5.1. Déroulement .....	13
5.2. Critères de caractérisation .....	13
<b>RESULTATS.....</b>	<b>15</b>
<b>1. Essais préliminaires .....</b>	<b>15</b>
1.1. Première approche .....	15
1.2. Premier aperçu de l'inclusivité et de la sensibilité analytique .....	17
<b>2. Evaluation complète .....</b>	<b>19</b>
2.1. Sensibilité analytique .....	19
2.2. Spécificité, inclusivité, et répétabilité .....	20
<b>CONCLUSION / DISCUSSION .....</b>	<b>26</b>
<b>BIBLIOGRAPHIES.....</b>	<b>27</b>
<b>TABLE DES ILLUSTRATIONS.....</b>	<b>28</b>
<b>TABLE DES TABLEAUX .....</b>	<b>28</b>

## Présentation de la structure

L'agence nationale de sécurité sanitaire de l'alimentation, de l'environnement et du travail (ANSES) est un organisme scientifique intervenant dans les domaines de l'environnement, du travail, de la santé, de l'alimentation et du bien-être des animaux et des végétaux. C'est une agence placée sous la tutelle des ministères de l'agriculture, de la santé, de l'environnement, du travail et de la consommation qui a pour missions principales [1] :

- D'évaluer les risques et d'éclairer l'action publique : évalue l'ensemble des risques auxquels chacun ou chacune d'entre nous peut être exposé au quotidien, au travail, pendant ses transports, ses loisirs ou via son alimentation.
  - De conduire une expertise scientifique : pour mieux connaître les risques et ainsi mieux les maîtriser afin d'élaborer des recommandations de santé publique.
  - De faire progresser la connaissance au service de la santé humaine, animale et végétale : elle qualifie les dangers, met en œuvre des activités de référence et conduit des travaux de recherche.



L'agence dispose d'un réseau de onze laboratoires de référence et de recherche, répartis sur le territoire. Ces laboratoires assurent des missions d'expertise, de surveillance épidémiologique, d'alerte et de conseil scientifique et technique.

Organigramme hiérarchique et fonctionnel de l'unité BVO du Laboratoire de la santé des végétaux

L'agence nationale de sécurité sanitaire de l'alimentation, de l'environnement et du travail

Directeur général: Roger Genet

Laboratoire de la santé des végétaux (LVS)

Directrice : Nathalie Franquet Adjointe : Géraldine Anthoine

Unité de bactériologie, virologie et OGM (Angers)

Chef d'unité : Françoise POLIAKOFF Adjoint : Pascal GENTIT

**Equipe Bactériologie**

Responsable d'équipe : Valérie OLIVIER

Adjointe : Carène RIVOAL

Agents :

Corinne AUDUSSEAU  
Sandrine PAILLARD  
Christelle DOUSSET  
Bruno LEGENDRE  
Dimitri MOLUSSON  
Amandine CUNTY

**Equipe Virologie**

Responsable d'équipe : Pascal GENTIT

Adjointe : Marianne LOISEAU

Agents :

Isabelle RENAUDIN  
Anne SAISON  
Pascaline COUSSEAU  
Michèle VISAGE  
Ahmed HAJRI  
Benoit REMENANT

**Equipe OGM**

Responsable d'équipe : Mathieu ROLLAND

Suppléant: David PORNIN

Agents :

Méryl LE GALLO  
Anne-Laure BOUTIGNY

**Fonctions transversales**

Secrétariat : Sylvie BAUMONT

Assistante qualité : Caroline MARTIN

Gestion des locaux : Luc NORDSTRÖM  
SCHÜLER

Informatique : Monique VILLAIN

Responsable qualité : Carène RIVOAL

Responsable consommables : Christèle  
DOUSSET

Les laboratoires de l'Anses détiennent 65 mandats de « laboratoire national de référence ». Ces mandats de référence reconnaissent la compétence des laboratoires à développer de nouvelles méthodes de diagnostic et d'analyse, de les valider et de les transférer à l'ensemble des laboratoires agréés pour assurer des contrôles sanitaires sur tout le territoire d'une façon homogène et maîtrisée.

L'Anses s'appuie sur ses différentes entités pour traiter de manière transversale la problématique de santé des végétaux. Le laboratoire de la santé des végétaux (LSV) exerce des missions de laboratoire de référence dans le domaine de la santé des végétaux sur les organismes phytopathogènes de quarantaine ainsi que sur les plantes invasives.

Le LSV réunit 80 personnes sur six sites (Angers, Montpellier, Nancy, Rennes, Saint-Pierre de la Réunion et Clermont-Ferrand), dont une station de quarantaine pour l'importation des végétaux en France. Ils couvrent respectivement la bactériologie, la virologie et les OGM, l'entomologie et les plantes invasives, la mycologie, la nématologie, et les ravageurs et agents pathogènes tropicaux. Les activités du LSV s'organisent autour de deux grands axes :

- La référence : harmonisation, optimisation et évaluation des méthodes d'analyses. Il réalise des prestations d'analyses réglementaires pour la détection des organismes phytopathogènes, ravageurs et plantes invasives, réparties entre les unités spécialisées référentes du laboratoire de la santé des végétaux et le réseau des laboratoires agréés par le ministère chargé de l'agriculture.
- L'expertise sur les risques biologiques pour la santé des végétaux et la coordination d'analyses des risques phytosanitaires.

L'unité se trouvant à Angers est l'unité « bactériologie, virologie et OGM » (BVO). L'unité est divisée en 3 équipes : une équipe virologie, une équipe bactériologie et une équipe OGM. L'unité d'Angers est implantée au sein d'un campus dédié au végétal, qui réunit des activités de recherche, de développement et d'enseignement supérieur. La station a agrandi ses locaux fin 2009, avec une augmentation des laboratoires, de la surface des serres et la création d'une salle de niveau de confinement P3.

L'unité BVO est désignée laboratoire de référence par arrêté ministériel selon les mandats suivants :

- Bactéries sur toutes matrices (sauf bananier, agrume et plantes tropicales).
- Viroïdes sur toutes matrices.
- Phytoplasmes sur toutes matrices.
- Virus sur toutes matrices (sauf bananier, plantes tropicales, agrumes, pommes de terre et sauf virus de la Sharka).
- OGM dans le maïs (parties végétatives), pomme de terre, riz, coton et blé (semences et parties végétatives).

A ce titre, l'unité BVO réalise des analyses officielles de diagnostic et de détection de ces organismes. Il confirme certains résultats obtenus par les autres laboratoires et a également une activité de caractérisation de méthode (développement de méthodes de référence pour la détection de pathogènes ou d'OGM suite à leur évaluation et leur validation). [2]

# Introduction

*Spiroplasma citri* est listé dans la directive (2009/7/CE modifiant les annexes de la directive 2000/29/CE) concernant les « mesures de protection contre l'introduction dans la Communauté d'organismes nuisibles aux végétaux ou aux produits végétaux et contre leur propagation à l'intérieur de la Communauté ». Les végétaux de la famille des rutacées tels que *Citrus* L., *Fortunella* Swingle, *Poncirus* Raf. et leurs hybrides doivent être contrôlés lors de leur introduction sur le territoire français (et européen) pour vérifier qu'ils ne sont pas porteur de ce pathogène. Afin de répondre à ce besoin réglementaire, il est nécessaire de disposer de méthodes de détection fiables et performantes. L'unité BVO et l'unité de quarantaine du laboratoire de la santé des végétaux ont souhaité évaluer les méthodes de détection de cette bactérie.

*Spiroplasma citri* est une espèce de spiroplasmes de la famille des *Spiroplasmataceae*. C'est une bactérie de la classe des Mollicutes qui ne possède pas de paroi cellulaire et qui a une morphologie hélicoïdale caractéristique (figure 1). Elle vit dans les tubes criblés du phloème.



Figure 1 : *S. citri* dans les tubes de la sève de pervenche inoculée par greffage (*Catharanthus roseus*) (INRA, Bordeaux)

x8000

Elle est l'agent pathogène responsable du « stubborn » des agrumes. Le nom « stubborn », entêté en français, provient du fait que les symptômes d'un arbre persistent lorsque l'on greffe en-tête des greffons sains. La maladie sévit dans les régions tempérées chaudes, notamment aux Etats-Unis et dans le bassin méditerranéen. La bactérie affecte tous les agrumes (particulièrement les orangers), mais peut aussi infecter de nombreuses espèces de plantes herbacées, souvent sans symptôme apparent. Elle est transmise par différentes espèces de cicadelles. Elle provoque une baisse des rendements importante avec des fruits petits et malformés. Les symptômes peuvent se trouver à différents endroits du végétal :

- Les fruits peuvent être rabougris, dissymétriques ou en forme de cupule (c'est-à-dire un zeste épais à la base et fin à l'extrémité, voir figure 2), et peuvent présenter des inversions de couleur (l'extrémité pédonculaire se décolore alors que l'extrémité du côté du style reste verte).
- Les feuilles sont plus courtes, plus larges, bombées, anormalement dressées, parfois marbrées ou chlorotiques. En condition très chaude, les feuilles de certaines pousses peuvent avoir leur extrémités déformées, pointues ou jaunes et en forme de cœur (critère de diagnostic très caractéristique).
- Les pousses peuvent être anormalement groupées et le développement de bourgeons axillaires peut entraîner l'apparition de balai de sorcières.

Les symptômes au champ peuvent toutefois être confondus avec ceux d'une carence nutritive ou bien avec ceux provoqués par d'autres bactéries du phloème tels que *Candidatus Liberibacter* spp. responsables du huanglongbing. [2]



Figure 2 : Symptômes de *S. citri* sur agrumes (J.-M. Bové, INRA Bordeaux)

Il existe plusieurs méthodes de détection. En effet, d'après la « fiche informative pour les organismes de quarantaine» préparé par le CABI et l'OEPP » [3], *Spiroplasma citri* peut être détecté par :

- Indexage biologique

*S. citri* peut être détecté par un greffage sur plantes indicatrices, celle qui convient le mieux est le cultivar d'oranger *Madame Vinous*, maintenu à 32°C le jour et 27°C la nuit. Le pamplemoussier cv. *Marsh* et cv. *Tangelos Sexton* sont d'autres plantes indicatrices possibles. Le meilleur inoculum est une portion de jeune feuille comprenant la nervure centrale.

- Culture *in vitro*

*S. citri* peut être cultivé de manière assez sûre à partir d'arbres présentant des symptômes, les meilleurs matériaux à utiliser sont les semences à des degrés variables d'avortement, les extrémités pédonculaires des fruits, ou les feuilles estivales marbrées récoltées en octobre. Les jeunes feuilles et les extrémités des tiges sont coupées finement et placées dans un milieu nutritif liquide contenant du sérum animal (SP4). Le pathogène est ensuite identifié par microscopie à fond noir ou par microscopie électronique qui toutes deux révèlent la présence de petites spirales en rotation dans un milieu liquide (voir figure 1). La croissance de *S. citri* change la couleur du milieu liquide, qui passe de rouge à ambre et provoque une légère turbidité dans les cultures au bout de 1-4 semaines.

- ELISA (Enzyme Link Immusorbent Assay)

C'est une technique immuno-enzymatique de détection qui permet de visualiser une réaction antigène anticorps grâce à une réaction colorée produite par l'action d'un substrat sur une enzyme fixé sur l'anticorps. Comme dit précédemment, l'organisme est facilement cultivable. Il est donc possible de produire des antisérum que l'on peut utiliser pour la technique ELISA. Des anticorps sont produits, couplés à une enzyme et utilisés pour détecter *Spiroplasma citri* dans les feuilles ou dans les insectes infectés.

- Hybridation moléculaire

L'hybridation moléculaire repose sur la capacité qu'on deux chaînes complémentaires de s'associer et de se dissocier en fonction de la température. Des séquences monocaténaires spécifiques et marquées, ou sondes, peuvent alors s'hybrider à des séquences cibles et leur présence peut ensuite être révélée, elles ne s'hybrideront que si l'agent pathogène est présent.

- Méthodes d'amplification génique

Il existe plusieurs méthodes d'amplification génique décrite dans la littérature qui ciblent des zones différentes du génome de *Spiroplasma citri*. L'unité de quarantaine et l'unité BVO ont décidé de se concentrer uniquement sur les méthodes d'amplification génique car les autres méthodes citées ci-dessus sont moins spécifiques et sensibles. De plus les méthodes de PCR (polymerisation chain reaction) sont faciles à mettre en œuvre et ne demandent pas beaucoup de temps de réalisation.

L'objet des travaux présentés dans ce rapport est la caractérisation des méthodes de détection de *S. citri* par amplification génique. Sur la base d'une étude bibliographique recensant ces méthodes, des méthodes ont été sélectionnées pour être testées. A l'issu des essais préliminaires, quelques méthodes ont été retenues pour être entièrement caractérisées.

Les exigences à remplir pour la validation de la méthode sont les suivantes :

- La méthode choisie doit être **la plus sensible possible** car la plupart du temps, en quarantaine, les plantes sont asymptomatiques. Ainsi, la méthode choisie sera la méthode ayant la meilleure sensibilité analytique.
- La méthode choisie doit être **la plus inclusive possible** (dans l'idéal une inclusivité de 100%), elle doit pouvoir détecter l'ensemble des cibles y compris les différentes souches ou isolats connus. Ainsi la méthode choisie doit également avoir **la meilleure inclusivité**.
- **La spécificité n'est pas le critère de 1<sup>er</sup> choix**, cependant la méthode sera écartée si elle produit un résultat positif sur une plante saine.
- La méthode doit également être **la plus répétable** et **la plus reproductible** possible.

# Matériels et méthodes

## 1. Echantillons d'ADN

Plusieurs échantillons ont été collectés pour pouvoir réaliser les essais:

- Des isolats de *Spiroplasma citri* provenant de différents pays et ayant été isolés sur différents végétaux. Il s'agit d'échantillons « cibles » donc si la méthode testée est inclusive, le résultat pour chacun de ces isolats doit être positif.
- Des isolats d'autres espèces de spiroplasmes infectant les plantes ou les insectes mellifères. Des extraits ADN (acide désoxyribonucléique) d'autres pathogènes infectant les rutacées. Des végétaux de la famille des rutacées considérés sains. Il s'agit d'échantillons « non cibles » donc si la méthode testée est spécifique, le résultat pour ces échantillons doit être négatif.

Le calcul des critères de validation doit se faire sur la base d'au moins 60 résultats. Ces résultats doivent être obtenus par l'analyse d'au moins 15 échantillons cibles avec deux réplicats de chaque, et par l'analyse d'au moins 15 échantillons non cibles avec également deux réplicats de chaque.

Pour évaluer la sensibilité analytique, deux extraits d'ADN positifs (Ip et Kp) dilués dans de l'ADN de rutacées saines (On et Qn), une série de dilution au dixième a été réalisée (5 niveaux de dilution et 6 répétitions par niveau).

Les échantillons sont référencés dans les tableaux ci-dessous

Tableau 1 : Référence des échantillons cibles

Identification	Organismes	Espèce	Provenance géographique	Origine	Nature
Ap	<i>Spiroplasma citri</i>	<i>Circulifer haematoceps</i>	Maroc	INRA Bordeaux	ADN
Bp	<i>Spiroplasma citri</i>	Oranger	Espagne	INRA Bordeaux	ADN
Cp	<i>Spiroplasma citri</i>	Oranger	Californie	INRA Bordeaux	ADN
Dp	<i>Spiroplasma citri</i>	Oranger	Californie	INRA Bordeaux	ADN
Ep	<i>Spiroplasma citri</i>	<i>Circulifer haematoceps</i>	France (Corse)	INRA Bordeaux	ADN
Fp	<i>Spiroplasma citri</i>	Oranger	Israël	INRA Bordeaux	ADN
Gp	<i>Spiroplasma citri</i>	Oranger	Turquie	INRA Bordeaux	ADN
Hp	<i>Spiroplasma citri</i>	Oranger	Maroc	INRA Bordeaux	ADN
Ip	<i>Spiroplasma citri</i>	Citrus	Californie	LSV UQ	Matériel lyophilisé
Jp	<i>Spiroplasma citri</i>	Citrus	Californie	LSV UQ	Matériel lyophilisé
Kp	<i>Spiroplasma citri</i>	Citrus	Californie	LSV UQ	Matériel lyophilisé
Lp	<i>Spiroplasma citri</i>	Citrus	Californie	LSV UQ	Matériel lyophilisé
Mp	<i>Spiroplasma citri</i>	Citrus	Californie	LSV UQ	Matériel lyophilisé
Np	<i>Spiroplasma citri</i>	Citrus	Californie	LSV UQ	Matériel lyophilisé
Op	<i>Spiroplasma citri</i>	Citrus	Californie	LSV UQ	Matériel lyophilisé
Pp	<i>Spiroplasma citri</i>	Citrus	Californie	LSV UQ	Matériel lyophilisé
Qp	<i>Spiroplasma citri</i>	Citrus	Californie	LSV UQ	Feuilles fraîches
Sp	<i>Spiroplasma citri</i>	Citrus	Californie	LSV UQ	ADN
Tp	<i>Spiroplasma citri</i>	Citrus	Californie	LSV UQ	ADN
Up	<i>Spiroplasma citri</i>	Carotte	Espagne	Université de Valence	ADN
Vp	<i>Spiroplasma citri</i>	Céleri	Espagne	Université de Valence	ADN

Tableau 2 : Référence des échantillons non cibles

Identification	Organismes	Espèce	Origine	Nature
Rp	<i>Eremocitru glauca</i>	/	LSV UQ	ADN
An	<i>Spiroplasma apis</i>	Abeille	INRA Bordeaux	ADN
Bn	<i>Spiroplasma melliferum</i>	Abeille	INRA Bordeaux	ADN
Cn	<i>Spiroplasma floricola</i>	Surface de plante	INRA Bordeaux	ADN
Dn	<i>Spiroplasma phoeniceum</i>	Pervenche	INRA Bordeaux	ADN
En	<i>Spiroplasma kunkelii</i>	/	INRA Bordeaux	ADN
Fn	<i>Spiroplasma sp</i>	Cicadelle	INRA Bordeaux	ADN
Gn	CMBV <i>Citrus mosaïque virus</i>	<i>Citrus jambhiri</i>	LSV UQ	Feuilles fraîches
Hn	CTV <i>Citrus tristeza virus</i>	/	LSV UQ	Feuilles fraîches
In	<i>Candidatus Liberibacter americanus</i>	/	LSV UQ	Matériel lyophilisé
Jn	<i>Candidatus Liberibacter africanus</i>	/	LSV UQ	Matériel lyophilisé
Kn	<i>Candidatus Liberibacter asiaticus</i>	<i>Citrus sinensis cv Madame vinous</i>	LSV UQ	Feuilles fraîches
Ln	CPsV <i>Citrus psorosis virus</i>	<i>C. reticulata x C.sinensis</i>	LSV UQ	Matériel lyophilisé
Mn	SDV <i>Satsuma dwarf virus</i>	/	LSV UQ	Matériel lyophilisé
Nn	CTLV <i>Citrus tatter leaf virus</i>	/	LSV UQ	Matériel lyophilisé
On	Végétaux sains	<i>Citrus x Volkameriana</i>	LSV UQ	Feuilles fraîches
Pn	Végétaux sains	<i>Citrus sinensis cv Madame vinous</i>	LSV UQ	Feuilles fraîches
Qn	Végétaux sains	<i>Citrus medica (Cédrat etrog)</i>	LSV UQ	Feuilles fraîches
Rn	Végétaux sains	<i>Citrus aurantium (bigaradier)</i>	LSV UQ	Feuilles fraîches
Sn	Végétaux sains	<i>Citrus aurantifolia (Lime mexicaine)</i>	LSV UQ	Feuilles fraîches
Tn	Végétaux sains	<i>Citrus sinensis x Poncirus trifoliata (carrizo)</i>	LSV UQ	Feuilles fraîches
Un	<i>Xylella fastidiosa</i>	Citrus	LSV Angers	ADN
Vn	Végétaux sains	<i>Aeglopsis chevalieri</i>	INRA CIRAD CITRUS BRC, San Giulano, France	Feuilles fraîches
Wn	Végétaux sains	<i>Atalantia ceylanica</i>	INRA CIRAD CITRUS BRC, San Giulano, France	Feuilles fraîches
Xn	Végétaux sains	<i>Balsamocitrus dawei</i>	INRA CIRAD CITRUS BRC, San Giulano, France	Feuilles fraîches
Yn	Végétaux sains	<i>Eremocitrus glauca</i>	INRA CIRAD CITRUS BRC, San Giulano, France	Feuilles fraîches
Zn	Végétaux sains	<i>Fortunella japonica</i>	INRA CIRAD CITRUS BRC, San Giulano, France	Feuilles fraîches
A1n	Végétaux sains	<i>Microcitrus australasica</i>	INRA CIRAD CITRUS BRC, San Giulano, France	Feuilles fraîches
B1n	Végétaux sains	<i>Poncirus trifoliata</i>	INRA CIRAD CITRUS BRC, San Giulano, France	Feuilles fraîches
C1n	Végétaux sains	<i>Swinglea glutinosa</i>	INRA CIRAD CITRUS BRC, San Giulano, France	Feuilles fraîches
Bnbis	<i>Spiroplasma melliferum</i>	/	DSMZ	Matériel lyophilisé
Cnbis	<i>Spiroplasma floricola</i>	/	DSMZ	Matériel lyophilisé
Dnbis	<i>Spiroplasma phoeniceum</i>	/	DSMZ	Matériel lyophilisé
Enbis	<i>Spiroplasma kunkelli</i>	/	DSMZ	Matériel lyophilisé

## 2. Extraction des acides nucléiques

Sachant que les PCR ne se réalisent qu'à partir de matrice d'ADN, il était nécessaire d'extraire l'ADN des échantillons que nous avions reçu sous forme lyophilisée ou sous forme de feuilles fraîches. La qualité et la pureté des acides nucléiques sont des facteurs critiques pour l'analyse PCR, il est donc important de bien réaliser cette étape. La méthode que nous avons utilisée est la méthode au CTAB (Cetyl trimethylammonium bromide) qui convient pour l'extraction et la purification d'ADN de végétaux. Elle se déroule en 3 grandes parties : la lyse cellulaire, l'extraction des acides nucléiques par séparation de phases et la précipitation/purification des acides nucléiques.

-Broyage de l'échantillon : Les échantillons (feuilles fraîches ou lyophilisats) sont tout d'abord broyés dans du tampon CTAB qui est composé de CTAB, d'EDTA (Ethylene diamine tetraacetic acid) et de Tris-HCl.

Le CTAB est un détergent qui permet la lyse des membranes des cellules. Comme la composition des lipides et celle du détergent sont semblables, le CTAB piège les lipides qui constituent la cellule et la membrane nucléique autorisant ainsi la libération de l'ADN génomique.

L'EDTA est un composant de chélation qui lie le magnésium, celui-ci est un cofacteur pour les DNase. En liant le Mg à l'EDTA, l'activité des DNases est diminuée.

La combinaison Tris/HCl permet une atténuation du pH du tampon, nécessaire car un trop fort ou trop faible pH endommage l'ADN. 1mL de broyat est récupéré et placé dans un tube de 2mL.

-Extraction de l'ADN : Du  $\beta$ -mercaptopropanol est rajouté au broyat, le  $\beta$ -mercaptopropanol permet de casser les ponts disulfures et ainsi de dénaturer les protéines (pour faciliter l'extraction). Une solution chloroforme : isoamyllique (24 :1) est ajoutée volume pour volume. Après centrifugation deux phases vont se former, une phase aqueuse dans laquelle se trouvent les acides nucléiques et une phase organique dans laquelle se trouvent tous les débris cellulaires que l'on veut éliminer.

-Précipitation de l'ADN soluble : La phase aqueuse est récupérée et mélangeée volume pour volume avec de l'isopropanol qui fait précipiter l'ADN. Après centrifugation, le surnageant est éliminé.

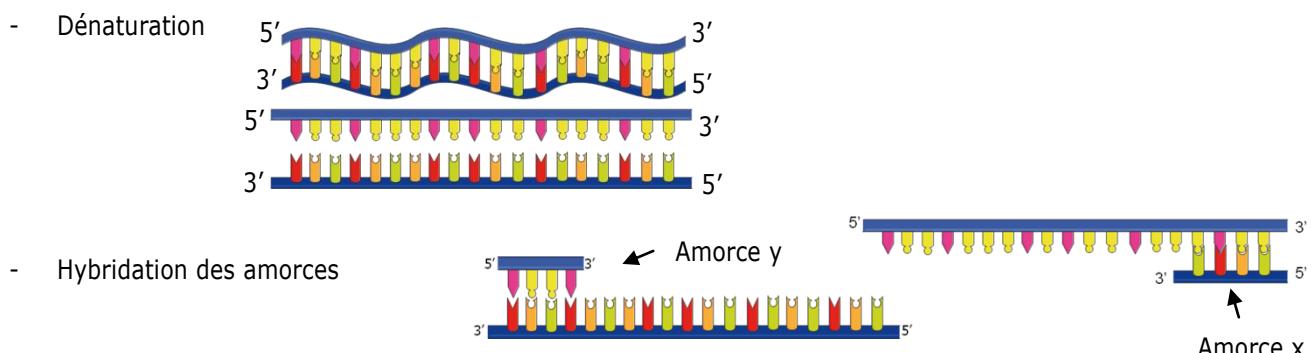
-Lavage des culots et solubilisation de l'ADN : L'ADN est rincé avec de l'éthanol absolu froid à 70%, après centrifugation le culot est séché puis solubilisé avec de l'eau ultra pure. [2]

### 3. PCR conventionnelle

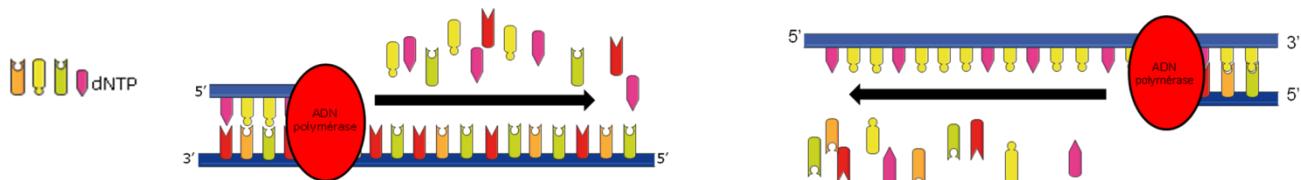
#### 3.1. Principe

Le principe de la PCR repose sur l'amplification de séquences cibles d'acides nucléiques par synthèse de brins d'ADN. Cette amplification est réalisée par une enzyme (ADN polymérase) permettant la synthèse d'ADN complémentaire, à partir de bases d'acide désoxyribonucléique et d'amorces complémentaires en présence de facteurs. Par un choix approprié d'amorces, assurant la spécificité de la réaction, on ne pourra amplifier qu'une portion bien définie de l'ADN. [4]

Plusieurs cycles de température constitués de plusieurs étapes se font suite :

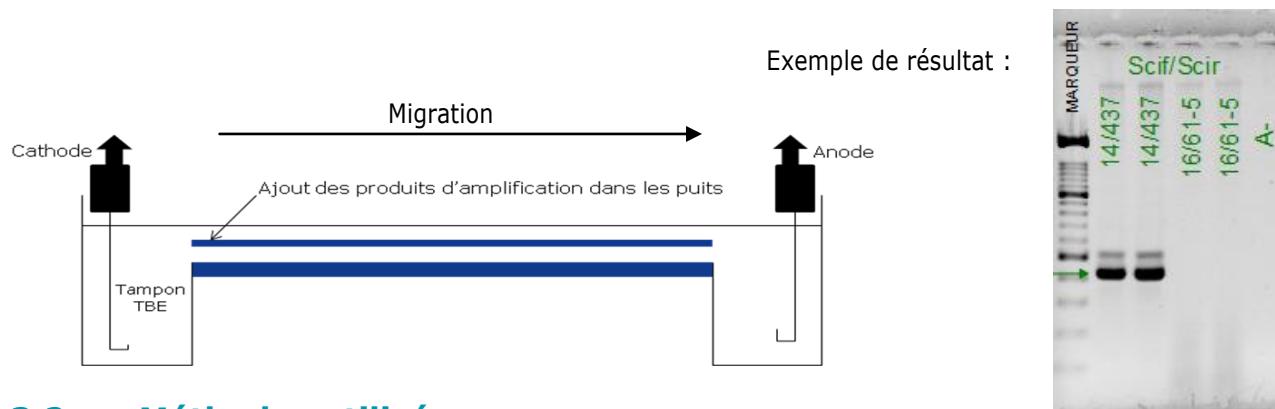


#### Synthèse de brins complémentaires dans le sens 5' – 3'



La répétition de ces cycles permet l'amplification exponentielle du fragment délimité par les zones d'appariement des amorces.

Avec une PCR conventionnelle (ou PCR en point final) les amplicons peuvent être caractérisés grâce à leurs propriétés de poids moléculaire. Cette caractérisation permet de s'assurer que les amplicons correspondent bien au fragment « attendu » défini par les zones d'appariement des amorces et donc aux agents phytopathogènes recherchés. L'ADN une fois amplifié, est déposé sur un gel d'agarose et soumis à une électrophorèse permettant de le faire migrer en fonction de sa taille. Suite à la migration, le gel est traité au BET (bromure d'éthydium). Le BET est une molécule intercalante de l'ADN qui est fluorescente lorsqu'elle est exposée aux ultraviolets.



### 3.2. Méthodes utilisées

Il existe un certain nombre de méthodes d'amplification génique en point final permettant la détection de *Spiroplasma citri*. Lors de la caractérisation de méthode effectuée, seule une partie de ces PCR ont été testées. Cinq PCR conventionnelles (PCRs) ont été choisies, elles ciblent différentes zones du génome dont un gène putatif des adhésines P89 et P58, le virus SpV1 intégré au génome de *S. citri*, le gène de la spiraline et le gène pE. Les différentes amorces existantes pour les méthodes de PCR sont répertoriées dans le tableau 3 :

Tableau 3 : Méthodes de PCR conventionnelles testées permettant la détection de *S. Citri*

Gène ciblé	Références	Nom des amorces	Séquences des amorces (5' à 3')	Taille attendue de l'amplicon
Gène putatif de l'adhésine P89	Yokomi et al, 2008 [5]	P89-f P89-r	ATTGACTCAACAAACGGGATAA CGGCCTTGTAAATTTGGTA	707 pb
Gène putatif de l'adhésine P58 (6f/4r)	Yokomi et al, 2008	P58-6f P58-4r	GCGGACAAATTAGTAATAAAAGAGC GCACAGCATTGCCAACTACA	450 pb
Virus intégré SPV1	Lee et al, 2006 [6]	RFP3 RFM3	TAGTTAGTAAAGCAATCGC GTTATACATCAATGTTACC	600 pb
Spiraline	Saillard, non publié	SC1 SC1'	ATTTCAATTGATGTTATCAAGACAAC CAAATCACTTGCGCTCCTGCATTGG	336 pb
pE	Khanchezar et al, 2012 [7]	Scif Scir	AACAACTCAATTATCACTTTG AAATTGGTCGCGTGCTTG	422 pb

Il existe d'autres méthodes de PCR dans la littérature permettant la détection de *Spiroplasma citri*. Les méthodes ci-dessus ont été choisies car elles ciblent différentes zones du génome mais également car des alignements ont été réalisés dans les bases de données publiques afin de voir qu'elles étaient les amores qui s'alignaient le mieux avec les séquences de *Spiroplasma citri* (pour les amores ciblant le gène de la spiraline et le virus SpV1 intégré). Ces tests on montré que :

- Les amores ciblant le virus intégré SpV1 qui semblent s'aligner le mieux avec les séquences disponibles sont celles de « Lee et al. 2006 »
- Les amores ciblant le gène de la spiraline qui s'alignent avec le plus de séquences de *Spiroplasma citri* sont celles non publiés de C. Saillard

## 4. PCR en temps réel

### 4.1. Principe

La PCR conventionnelle et la PCR en temps réel reposent sur le même principe concernant l'amplification mais se distinguent par la manière de mettre en évidence les amplicons. Avec la PCR en temps réel la mise en évidence des amplicons s'effectue en cours de synthèse, à chaque cycle d'amplification, la quantité d'ADN totale est mesurée grâce à un marqueur fluorescent :

- Utilisation de marqueurs spécifiques : sondes d'hydrolyse, sonde d'hybridation, sonde scorpions, etc....
  - Utilisation de marqueurs fluorescents aspécifiques intercalant de l'ADN : SybrGreen, HRM dye, etc....
- L'agent intercalant utilisé dans une PCR en temps réel, peu fluorescent à l'état libre, doit d'une part augmenter en fluorescence lorsqu'il est lié à l'ADN double brin et, d'autre part ne pas inhiber la réaction de PCR.

L'étude comporte des PCR avec SybrGreen et des PCR avec une sonde de type Taqman®.

- Les sondes de type TaqMan® sont marquées à leur extrémité 5' par un fluorochrome émetteur (reporter), par exemple, FAM, et à leur extrémité 3' par un suppresseur (quencher) qui inhibe l'émission du reporter lorsqu'ils sont à proximité. Au cours de la PCR, si la sonde est hybridée sur sa cible, elle est hydrolysée par l'ADN polymérase (activité exonucléasique). Le reporter ainsi séparé du quencher émet un signal proportionnel au nombre de sondes hydrolysées, mesurable au moment de l'elongation (figure 3). La spécificité de la réaction est liée à la fois à celle des amores et à celle de la sonde réduisant significativement l'émission de fluorescence non spécifique due à des mésappariements ou des dimères d'amore.

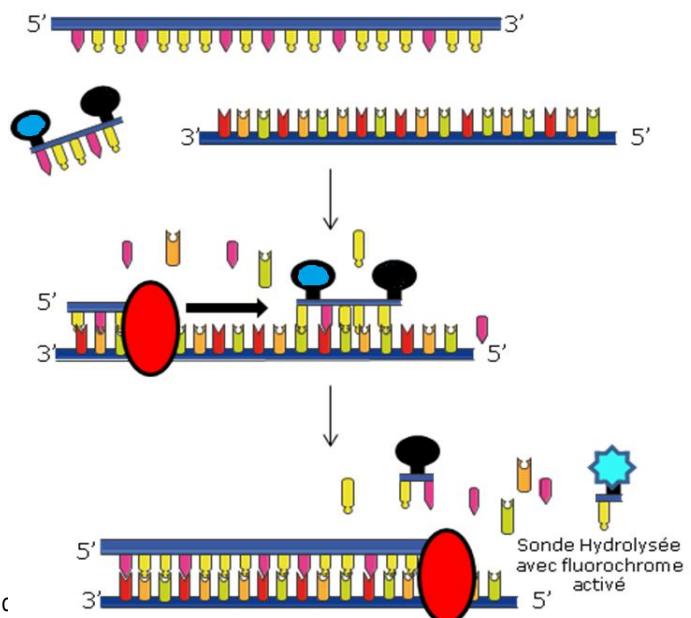


Figure 3 : Principe de la PCR en temps réel avec une sonde de type Taqman®

- Le SybrGreen est un intercalant spécifique de l'ADN double brin. Sous une excitation de 480nm, il émet un signal de fluorescence. Le complexe ADN double brin/SybrGreen absorbe la lumière bleue ( $\lambda_{max}=480\text{nm}$ ) et émet de la lumière verte ( $\lambda_{max}=520\text{ nm}$ ). La fluorescence du SybrGreen augmente quand la molécule est intercalée dans le double brin d'ADN. Une fois fixé, le SybrGreen devient très bon fluorophore. Pendant l'elongation, de plus en plus de SybrGreen se fixe aux amplicons, le signal de fluorescence augmente, celui-ci est mesuré à la fin de chaque elongation (figure 4). Une courbe de fusion doit être réalisée pour pouvoir déterminer que le produit amplifié est bien celui recherché. Elle est réalisée à la fin de l'amplification, il s'agit de soumettre les amplicons à une élévation progressive de la température de 59°C à 95°C en mesurant l'émission de fluorescence tous les 0-1°C. On obtient une courbe correspondant à la variation de la fluorescence en fonction de la température (figure 5). Si un seul pic apparaît, alors un seul produit d'amplification est présent, et son Tm sera spécifique de la réaction d'amplification. [4]

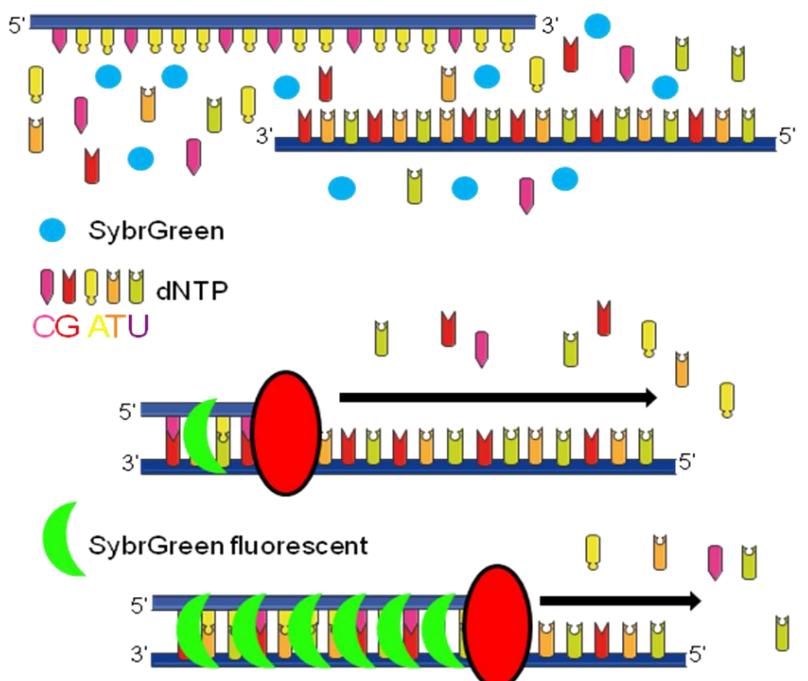


Figure 4 : Principe de la PCR en temps réel avec du SybrGreen

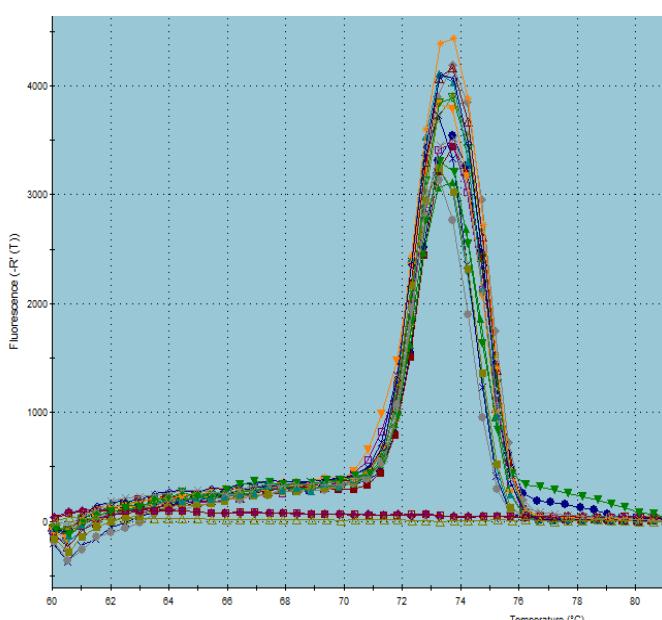


Figure 5 : Exemple de courbe de fusion

## 4.2. Méthodes utilisées

Il existe un certain nombre de méthodes d'amplification génique en temps réel permettant la détection de *Spiroplasma citri*. Lors de la caractérisation de méthode, seule une partie des PCR ont été testées. Sept PCR en temps réel ont été choisies, elles ciblent différentes zones du génome dont un gène putatif de l'adhésine P58, le virus intégré au génome de *S. citri*, et le gène de la spiraline. Les différentes amores existantes pour les méthodes de PCR sont répertoriées dans le tableau 4

Tableau 4 : Méthodes de PCR en temps réel testées permettant la détection de *S. Citri*

Gène ciblé	Références	Nom des amores	Séquences des amores (5' à 3')	Taille attendue de l'amplicon
Gène putatif de l'adhésine P58 (3f/4r)	Yokomi et al, 2008	P58-3f P58-4r	GTCCCTAATGCACCGTGAAAA GCACAGCATTGCCAACTACA	119 pb
Spiraline	Wang et al, 2015 [7]	Spiralin-F Spiralin-R	GTCGGAACAACATCAGTGGT TGCTTTGGTGGTGTAAATG	79 pb
Virus intégré SpV1-ORF1	Wang et al, 2015	Php-orf1-F Php-orf1-R	TGGCAGTTTGTTAGTCATCC GGGTCTAACGCCGTTAAAGT	190 pb
Virus intégré SpV1-ORF3	Wang et al, 2015	Php-orf3-F Php-orf3-R	CTGGTTCACCAACAAAAA AAACACGGTCGGAGTTATCA	149 pb

Des alignements et des essais de dessins de sonde ont été réalisés à l'aide du logiciel Geneious. Suite à ces essais les amores et sondes du tableau 5 ont également été testées.

Tableau 5 : Oligos de PCR en temps réel dessinés pour cette étude et permettant la détection de *S. citri*

Gène ciblé	Nom des amores	Séquence des amores (5' à 3')	Taille attendue de l'amplicon
Gène putatif de l'adhésine P58	P58-3f* P58-4r* ScP58-p	RTYCCYAATGCMCCGWAAAA GCACAGCATTKGSCASKACA AGGAAGTCGTTAGTGYTAAACT	119 pb
Spiraline	Spiralin-F Spiralin-R*	AAGCAGTGCAAGGAGTTGTAAAAAA TGATKYACCTTGTTGTCTGATAAACAA	79 pb
Gène putatif de l'adhésine P58	P58-3f P58-4r ScP58-p	GTCCCTAATGCACCGTGAAAA GCACAGCATTGCCAACTACA AGGAAGTCGTTAGTGYTAAACT	119 pb

## 5. Méthodologie de caractérisation

### 5.1. Déroulement

La caractérisation de méthodes consiste en l'évaluation des caractéristiques d'une méthode. Les méthodes que nous avons caractérisées permettent la détection de *Spiroplasma citri* par amplification génique. La caractérisation de méthodes s'est déroulée en plusieurs étapes [2]:

- Etude de faisabilité et établissement du cahier des charges avec la station de quarantaine (utilisateur final)

Cette étude de faisabilité se base en partie sur une étude bibliographique (lecture de publications scientifiques portant sur le sujet) ainsi que sur des échanges avec des experts techniques.

- Planification

Le responsable du projet rédige un plan d'étude pour la caractérisation d'une méthode décrivant les modalités de mise en œuvre du projet (et notamment la planification des opérations de laboratoire). Cet enregistrement est vérifié et signé par l'ensemble de l'équipe du projet qui s'engage à en respecter les termes.

- Choix des échantillons de référence

Constitution d'une collection de référence, c'est-à-dire un choix des échantillons cibles et des échantillons non cibles servant de support à la caractérisation de la méthode d'analyse.

- Réalisation des opérations de laboratoire puis analyse des données et interprétation des résultats

Se compose d'un essai préliminaire puis d'une évaluation complète. L'essai préliminaire permet de tester les différentes méthodes choisies et d'avoir un premier aperçu des résultats qu'elles peuvent donner, suite à ces essais certaines de ces méthodes sont éliminées de l'étude. Les méthodes ayant donné les meilleurs résultats lors des essais préliminaires sont complètement caractérisées pour déterminer leurs différentes performances.

La période de mon stage correspond à cette dernière étape, mon but étant de réaliser les opérations de laboratoire et d'analyser les résultats afin de rendre un rapport.

### 5.2. Critères de caractérisation

La caractérisation de la méthode de détection par amplification génique de *Spiroplasma citri* a été réalisée selon le guide méthodologique interne de l'ANSES : « Guide méthodologique de caractérisation des critères de performance des méthodes d'analyses qualitative en vue de leur validation ». [9]

Les critères de performances évalués lors de cette étude sont la spécificité relative, l'inclusivité, la sensibilité analytique, et la répétabilité.

- **Spécificité relative**

C'est la capacité d'une méthode à ne fournir que des résultats conformes sans faux positif.

Le calcul de la spécificité (relative) est fait de la façon suivante:  $SP = 100 \times NA / (NA + PD)$

- SP = Spécificité relative
- NA = Négatif accord (vrais négatifs)
- PD = Positif désaccord (faux positifs)

Pour tester la spécificité d'une méthode, il convient de tester :

- Des échantillons non contaminés par l'organisme cible = matrices dites « saines »

- Des échantillons non contaminés par l'organisme cible mais contaminés par des analytes non cibles ou des organismes proches génétiquement et susceptibles de fournir des résultats faussement positifs, dont les saprophytes.

- **Inclusivité**

C'est la capacité d'une méthode à détecter l'ensemble des cibles y compris les différents souches ou isolats connus.

Le calcul de l'inclusivité est fait de la façon suivante :  $SE = 100 \times PA / (ND + PA)$

- SE = Sensibilité relative
- PA = Positif accord (vrais positifs)
- ND = Négatif désaccord (faux négatifs)

Pour tester l'inclusivité d'une méthode, il convient de tester la gamme d'isolats de la cible la plus large possible (différentes provenances géographiques, différentes plantes hôtes).

- **Sensibilité analytique**

Capacité de la méthode à détecter la plus petite quantité possible de la cible. Le seuil de détection sera considéré comme « relatif » lorsque la cible n'est pas quantifiable. Il pourra être exprimé en niveau de dilution. Pour tester la sensibilité analytique d'une méthode, il convient de tester des échantillons dont la cible est présente dans des proportions faibles.

- **La répétabilité**

C'est l'étroitesse d'accord entre des résultats successifs et indépendants obtenus avec la même méthode en utilisant un matériau d'essai identique, dans des conditions identiques (appareillage, opérateur, laboratoire et intervalles de temps courts, c'est-à-dire des conditions de répétabilité).

Le calcul de la répétabilité peut se faire en exploitant les résultats obtenus pour le calcul des critères de performance précédents (inclusivité, spécificité, seuil de détection).

# Résultats

## 1. Essais préliminaires

Le but de l'essai préliminaire est de savoir si les PCR fonctionnent pour la détection de *Spiroplasma citri* mais également d'avoir un premier aperçu de l'inclusivité et de la sensibilité analytique des méthodes.

### 1.1. Première approche

Cinq méthodes de PCR conventionnelle et sept méthodes de PCR en temps réel ont été testées. Le but étant de savoir, dans un premier temps, si les PCR fonctionnent sur un témoin positif et un témoin négatif chacun répété deux fois. Le mélange réactionnel et les cycles d'amplification pour chaque PCR sont décrits dans l'annexe1.

Les essais ont été effectués sur un échantillon connu positif pour *Spiroplasma citri* (14/437=16/47-4) et sur un échantillon sain, échantillon *Citrus aurantifolia* (ou Lime mexicaine -> 16/61-5).

Les résultats obtenus pour les PCR en point final testées sont présentés sur la figure 6 et le tableau 6.

- Marqueur de taille : 100pb
- Voltage : 135 V/cm
- Tampon TBE à 1.5%

Les flèches indiquent le nombre de pb attendu (endroit où doit se situer la bande).

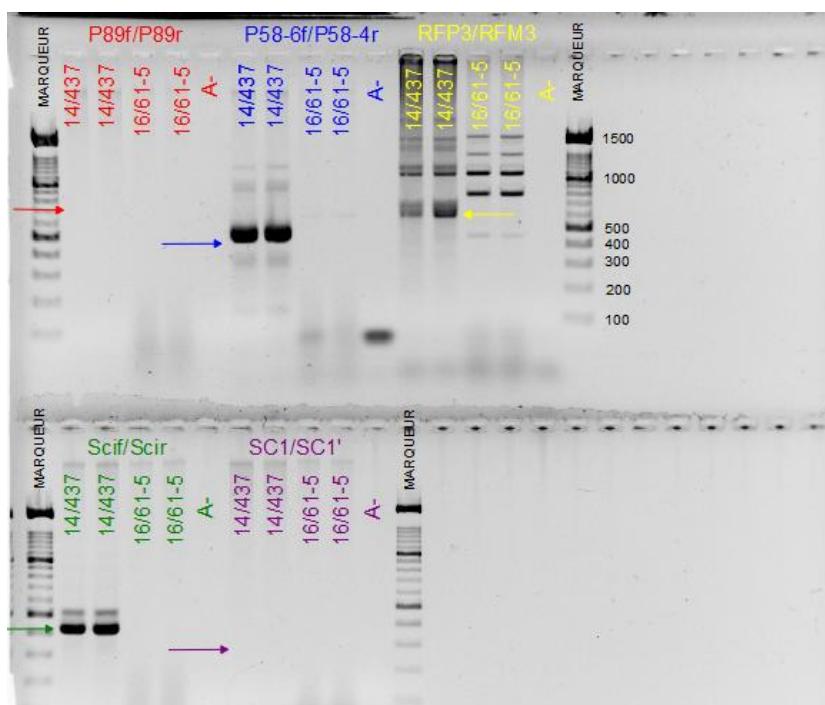


Figure 6 : Photo du gel d'électrophorèse après révélation (première approche)

Tableau 6 : Résultats des premiers essais des PCR conventionnelles

Méthodes	Yokomi et al., 2008 (P89)	Yokomi et al., 2008 (P58)	Lee et al., 2006 (virus intégré)	Khanchezar et al., 2012 (pE)	Saillard (Spiraline)
T+ (14/437)	-	-	+	+	+
T- (16/61-5)	-	-	-	-	-

+ = amplification / - = pas d'amplification

Il n'y a pas d'amplification pour les PCR « Yokomi et al., 2008» ciblant le gène P89 et « Saillard » ciblant le gène de la spiraline, soit dû à un problème lors de la PCR, soit dû au fait que la méthode n'est pas inclusive.

Ces deux PCR sont donc exclues du reste de l'étude sans essai supplémentaire car nous disposons de suffisamment de PCR ciblant différentes zones du génome.

Les autres PCR ont données des résultats conformes. On observe des bandes distinctes à la taille attendue pour chacune d'entre elles (voir figure 6). Elles sont donc retenues pour la suite de l'étude. Cependant, il y a aussi présence de bandes surnuméraires, elles seront donc éventuellement à optimiser avant la caractérisation complète.

Les résultats obtenus lors de l'essai pour les techniques PCR en temps réel testées sont synthétisés dans le tableau 7.

Tableau 7 : Résultats des premiers essais des PCR en temps réel

Méthodes	Wang et al. 2015 (Virus intégré SpV1-ORF1)	Wang et al. 2015 (Virus intégré SpV1-ORF3)	Wang et al. 2015 (Spiraline)	Wang et al. 2015 (Spiraline avec amorce deg)	Yokomi et al. 2008 (P58)	DVP LSV UBVO SONDE + AMORCE DEG (P58)	DVP LSV UBVO SONDE + AMORCE NON DEG (P58)
T+ (14/437)	-	-	+	+	+	+	+
T- (16/61-5)	-	-	-	-	-	-	-

+ = Amplification / - = pas d'amplification

Il n'y a pas eu d'amplification pour la PCR « Wang et al, 2015 » ciblant le gène du virus intégré, soit dû à un problème lors de la PCR, soit dû au fait que la méthode n'est pas inclusive. Cette PCR est donc exclue du reste de l'étude. La PCR « DVP LSV UBVO SONDE + AMORCE DEG » est également éliminée du reste de l'étude, car même si celle-ci a donné des résultats conformes, le cycle à partir de duquel la fluorescence devient détectable est trop tardif (environ 36, alors que les autres PCR ont un Ct d'environ 26-29).

Les autres PCR ont donné des résultats conformes, il y a eu amplification (apparition d'un Ct, cycle à partir duquel la fluorescence devient détectable, environ au bout de 26 à 29 cycles). Elles sont donc retenues pour la suite de l'étude.

Il est important de noter la Tm obtenue (tableau 8) à l'aide de la courbe de fusion réalisée pour les PCR utilisant le SybrGreen, cette température est spécifique car elle dépend de la séquence de l'amplicon obtenu après amplification et nous permet de dire que nous avons bien amplifié le gène ciblé. Ces Tm nous ont servis de référence pour les prochaines PCR.

Tableau 8 : Tm obtenus pour les PCR en temps réel utilisant le SybrGreen

Méthode	Wang et al, 2015 (Virus intégré)	Wang et al,. 2015 (Spiraline)	Wang et al, 2015 avec Spiralin-Rdeg	Yokomi et al, 2008 (P58)
Tm (°C) Stratagène	72.88 ± 0.03	75.29 ± 0.15	75.26 ± 0.19	73.52 ± 0.24
Tm (°C) Biorad	72 ± 0.5	74 ± 0.5	/	72 ± 0.5

Tableau récapitulatif (les PCR retenues pour la suite sont colorées en bleu):

	Méthode	Nom des amorces	Gène ciblé	Conforme	
PCR CONVENTIONNELLES	Yokomi et al. 2008	P89r/P89f	Gène putatif de l'adhésine P89	NON	
	Yokomi et al. 2008	P58-6f/P58-4r	Gène putatif de l'adhésine P58	OUI	
	Lee et al. 2006	RFP3/RFM3	Virus intégré	OUI	
	Khanchezar et al. 2012	Scif/Scir	pE	OUI	
	Saillard	SC1/SC1'	Spiraline	NON	
					Ct moyen
PCR EN TEMPS REEL	Wang et al. 2015	Php-orf1-F/Php-orf1-R	Virus intégré SpV1-ORF1	NON	
	Wang et al. 2015	Php-orf3-F/Php-orf3-R	Virus intégré SpV1-ORF3	OUI	26,73
	Wang et al. 2015	Spiralin-F/Spiralin-R	Spiraline	OUI	29,16
	Wang et al. 2015	Spiralin-F/Spiralin-Rdeg	Spiraline	OUI	29,24
	Yokomi et al. 2008	P58-3f/P58-4r	Gène putatif de l'adhésine P58	OUI	26,545
	Développement LSV UBVO	P58-3fdeg/P58-4rdeg ScP58-p	Gène putatif de l'adhésine P58	OUI / NON (Ct tardif)	36,3
	Développement LSV UBVO	P58-3f/P58-4r ScP58-p	Gène putatif de l'adhésine P58	OUI	29,33

## 1.2. Premier aperçu de l'inclusivité et de la sensibilité analytique

Les essais ont été effectués sur une gamme d'isolats de *Spiroplasma citri* (pour avoir un aperçu de l'inclusivité) et sur une gamme de dilution (au dixième) d'un extrait d'ADN positif dans de la matrice saine (pour avoir un aperçu de la sensibilité analytique).

Les résultats obtenus pour les PCR en point final testées sont présentés sur les figures 7, 8, 9 et le tableau 9

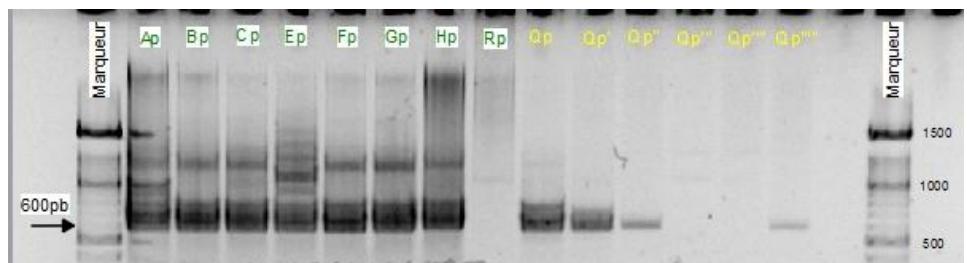


Figure 7 : Photo du gel d'électrophorèse après révélation Lee et al. 2006 (ciblant le virus intégré)

- Marqueur de taille : 100pb
- Voltage : 135 V/cm
- Tampon TBE à 1.5%

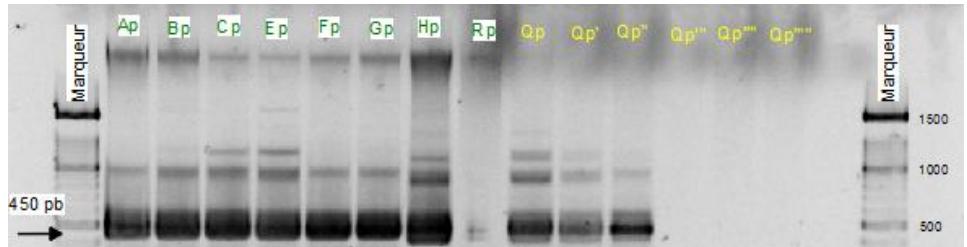


Figure 8 : Photo du gel d'électrophorèse après révélation Yokomi et al. 2008 (ciblant le gène P58)

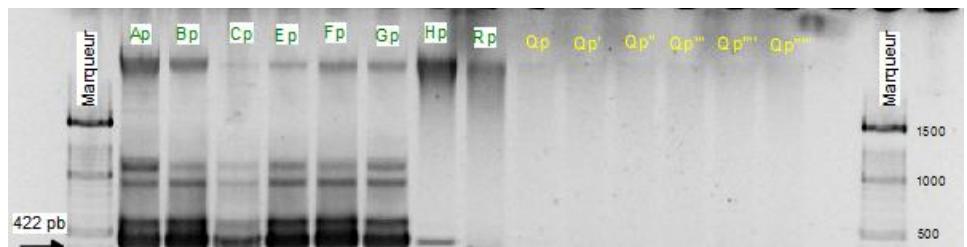


Figure 9 : Photo du gel d'électrophorèse après révélation Khanchezar et al. 2012 (ciblant le gène pE)

Tableau 9 : Résultats de l'étude préliminaire pour les PCR conventionnelles

L'échantillon Rp est un échantillon sain.		Lee et al., 2006 (Virus intégré)	Yokomi et al., 2008 (P58)	Khanzezar et al., 2012 (pE)
Inclusivité	Ap ( <i>S. citri</i> Maroc)	+	+	+
	Bp ( <i>S. citri</i> Espagne)	+	+	+
	Cp ( <i>S. citri</i> Californie)	+	+	+
	Ep ( <i>S. citri</i> France)	+	+	+
	Fp ( <i>S. citri</i> Israël)	+	+	+
	Gp ( <i>S. citri</i> Turquie)	+	+	+
	Hp ( <i>S. citri</i> Maroc)	+	+	+
Sensibilité	Qp ( <i>S. citri</i> Californie)	+	+	-
	Qp $10^{-1}$	+	+	-
	Qp $10^{-2}$	+	+	-
	Qp $10^{-3}$	-	-	-
	Qp $10^{-4}$	-	-	-
	Qp $10^{-5}$	+	-	-

Les PCR «Lee et al, 2006 » ciblant le virus intégré et « Yokomi et al, 2008 » ciblant le gène P58 ont la même inclusivité, elles donnent toutes des résultats positifs pour les 7 échantillons cibles (ainsi que Qp). La troisième

La PCR « Khanzechar et al, 2012 » ciblant le gène pE ne donne pas de résultats positifs pour Qp, nous ne pouvons donc pas avoir d'aperçu de la sensibilité de la méthode. Cette méthode est donc exclue du reste de l'étude.

Les résultats obtenus pour les PCR en temps réel sont synthétisés dans le tableau 10, les résultats plus détaillés sont synthétisés dans l'annexe 2.

Un résultat est considéré comme positif si la fluorescence émise est significativement supérieure au bruit de fond (Ct obtenu en fin d'amplification) mais aussi si le Tm de l'amplifiât est spécifique du produit d'amplification ciblé (Tm égal à la moyenne des Tm des échantillons reconnus positifs  $\pm$  écart type, voir tableau 6).

Tableau 10 : Résultats de l'étude préliminaire pour les PCR en temps réel

		Wang et al. 2015 (virus intégré)	Wang et al. 2015 (Spiraline)	Wang et al. 2015 (Spiraline avec amorce deg )	Yokomi et al. 2008 (P58)	DVP LSV UBVO Sonde et amores P58-3f/P58-4r
Inclusivité	Ap ( <i>S. citri</i> Maroc)	+	+	+	+	+
	Bp ( <i>S. citri</i> Espagne)	+	+	+	+	-
	Cp ( <i>S. citri</i> Californie)	+	+	+	+	+
	Ep ( <i>S. citri</i> France)	+	+	+	+	+
	Fp ( <i>S. citri</i> Israël)	+	+	+	+	+
	Gp ( <i>S. citri</i> Turquie)	-	+	+	+	+
	Hp ( <i>S. citri</i> Maroc)	-	+	+	+	+
Sensibilité	Qp	+	+	+	+	+
	Qp $10^{-1}$	+	+	+	+	+
	Qp $10^{-2}$	+	-	-	+	+
	Qp $10^{-3}$	-	-	-	+	+
	Qp $10^{-4}$	-	-	-	-	+
	Qp $10^{-5}$	-	-	-	-	-

Certains échantillons ne sortent pas positifs dans certaines PCR (exemple : Hp dans la PCR « Wang et al, 2015 » ciblant le virus intégré), mais ce n'est pas un problème d'inclusivité car ceux-ci ont déjà produits un résultat positif avec les même couples d'amorces dans des essais précédents. Il s'agit peut-être plus d'un problème de reproductibilité.

## 2. Evaluation complète

Après discussion avec l'unité de quarantaine, nous avons décidé pour la suite de l'étude de ne continuer que sur les PCR en temps réel. En effet, celles-ci sont plus rapides car elles possèdent une étape de révélation en moins comparé au PCR conventionnelle.

Quatre PCR ont donc été choisies pour la suite, elles ciblent différentes zones du génome et utilisent différents procédés de révélation de l'amplification (SybrGreen et Sonde) :

- « Wang et al, 2015 » ciblant le virus intégré
- « Wang et al, 2015 » ciblant la spiraline et utilisant les amores non dégénérées
- « Yokomi et al, 2008 » ciblant le gène P58
- « DVP LSV UBVO » ciblant le gène P58 et utilisant une sonde de type TaqMan®

### 2.1. Sensibilité analytique

Les résultats obtenus pour l'étude de la sensibilité analytique sont synthétisés dans les tableaux 11, 12, 13 et 14.

Tableau 11 : Résultats de la sensibilité analytique pour la PCR « Wang et al, 2015 » ciblant le virus intégré

	Rep1	Rep2	Rep3	Rep4	Rep5	Rep6		Rep1	Rep2	Rep3	Rep4	Rep5	Rep6
Ip	+	+	+	+	+	+	Kp	+	+	+	+	+	+
Ip'10-1	+	+	+	+	+	+	Kp'10-1	+	+	+	+	+	+
Ip''10-2	-	-	-	-	-	-	Kp''10-2	+	+	+	+	+	+
Ip'''10-3	-	-	-	-	-	-	Kp'''10-3	-	-	-	-	-	-
Ip''''10-4	-	-	-	-	-	-	Kp''''10-4	-	-	-	-	-	-
Ip'''''10-5	-	-	-	-	-	-	Kp'''''10-5	-	-	-	-	-	-

Tableau 12 : Résultats de la sensibilité analytique pour la PCR « Wang et al, 2015 » ciblant le gène de la Spiraline

	Rep1	Rep2	Rep3	Rep4	Rep5	Rep6		Rep1	Rep2	Rep3	Rep4	Rep5	Rep6
Ip	+	+	+	+	+	+	Kp	+	+	+	+	+	+
Ip'10-1	+	+	+	-	-	+	Kp'10-1	+	+	+	+	+	+
Ip''10-2	-	-	-	-	-	-	Kp''10-2	-	+	-	-	-	-
Ip'''10-3	-	-	-	-	-	-	Kp'''10-3	-	-	-	-	-	-
Ip''''10-4	-	-	-	-	-	-	Kp''''10-4	-	-	-	-	-	-
Ip'''''10-5	-	-	-	-	-	-	Kp'''''10-5	-	-	-	-	-	-

Tableau 11 : Résultats de la sensibilité analytique pour la PCR « Yokomi et al, 2008 » ciblant le gène P58

	Rep1	Rep2	Rep3	Rep4	Rep5	Rep6		Rep1	Rep2	Rep3	Rep4	Rep5	Rep6
Ip	+	+	+	+	+	+	Kp	+	+	+	+	+	+
Ip' 10-1	+	+	+	+	+	+	Kp' 10-1	+	+	+	+	+	+
Ip" 10-2	+	+	+	+	+	+	Kp" 10-2	+	+	+	+	+	+
Ip''' 10-3	+	+	-	+	-	+	Kp''' 10-3	+	+	-	+	+	+
Ip'''' 10-4	-	-	-	-	-	-	Kp'''' 10-4	-	-	-	-	-	-
Ip''''' 10-5	-	-	-	-	-	-	Kp''''' 10-5	-	-	-	-	-	-

Tableau 12 : Résultats de la sensibilité analytique pour la PCR « LSV DVP UBVO » ciblant le gène P58

	Rep1	Rep2	Rep3	Rep4	Rep5	Rep6		Rep1	Rep2	Rep3	Rep4	Rep5	Rep6
Ip	-	+	+	+	+	+	Kp	+	+	+	+	+	+
Ip' 10-1	+	+	+	+	+	+	Kp' 10-1	+	+	+	+	+	+
Ip" 10-2	+	+	+	+	+	+	Kp" 10-2	+	+	+	+	-	+
Ip''' 10-3	+	-	+	+	+	+	Kp''' 10-3	-	-	-	+	+	-
Ip'''' 10-4	-	-	-	-	-	-	Kp'''' 10-4	-	-	+	-	-	-
Ip''''' 10-5	-	-	-	-	-	-	Kp''''' 10-5	-	-	-	-	-	-

Sachant que la cible n'est pas quantifiable, le seuil de détection est considéré comme relatif et est exprimé en niveau de dilution. Il serait possible de quantifier la cible si nous avions cultivé puis dénombré Spiroplasma citri pour calibrer des solutions connues en bactéries mais nous n'avons pas choisi cette option car :

- La quarantaine a besoin d'une réponse de type « présence / absence ».
- Comme il s'agit de choisir la méthode la plus sensible, une comparaison entre deux méthodes sur des échantillons et niveaux de dilution identiques suffit.

La PCR « Wang et al, 2015 » ciblant le gène de la spiraline a une sensibilité analytique de  $10^{-1}$ . La PCR «Wang et al, 2015» ciblant le virus intégré a une sensibilité analytique entre  $10^{-1}$  et  $10^{-2}$ . La PCR ayant la meilleure sensibilité analytique est la PCR « Yokomi et al, 2008 » ciblant le gène putatif de l'adhésine P58, elle a une sensibilité analytique de  $10^{-2}$  à  $10^{-3}$ . La sonde n'apporte pas de sensibilité plus importante par rapport aux PCR utilisant le SybrGreen et donne des résultats moins répétables.

## 2.2. Spécificité, inclusivité, et répétabilité

Les résultats obtenus pour l'évaluation complète des méthodes (pour déterminer la spécificité, l'inclusivité, et la répétabilité) sont synthétisés dans le tableau ci après. Le statut de l'échantillon correspond au résultat attendu, le chiffre 1 correspond à un résultat positif et le chiffre 0 correspond à un résultat négatif. (NT= non testé)

Code	Statut	PCR en temps réel "Wang et al, 2015" ciblant le gène de la Spiraline				PCR en temps réel "Wang et, 2015" ciblant le Virus intégré				PCR en temps réel "Yokomi et al, 2008" ciblant le gène P58				PCR en temps réel "DVP LVS UBVO"			
		Rep 1	Rep 2	Rep 3	Répétabilité	Rep 1	Rep 2	Rep 3	Répétabilité	Rep 1	Rep 2	Rep 3	Répétabilité	Rep 1	Rep 2	Rep 3	Répétabilité
Ap	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
Bp	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
Cp	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
Dp	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
Ep	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
Fp	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
Gp	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
Hp	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
Ip	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
Jp	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	NT	1	1	1	NT	1
Kp	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
Lp	1	1	1	NT	1	1	1	NT	1	1	1	NT	1	1	1	NT	1
Mp	1	1	1	NT	1	1	1	NT	1	1	1	NT	1	1	1	NT	1
Np	1	0	0	NT	1	1	0	NT	0,5	1	1	NT	1	1	1	NT	1
Op	1	0	0	NT	1	1	0	NT	0,5	1	1	NT	1	1	1	NT	1
Pp	1	1	1	NT	1	1	1	NT	1	1	1	NT	1	1	1	NT	1
Qp	1	1	1	NT	1	1	1	NT	1	1	1	NT	1	1	1	NT	1
Sp	1	1	1	NT	1	1	1	NT	1	1	1	NT	1	1	1	NT	1
Tp	1	1	1	NT	1	1	1	NT	1	1	1	NT	1	1	1	NT	1
Up	1	1	1	NT	1	1	1	NT	1	1	1	NT	1	1	1	NT	1
Vp	1	1	1	NT	1	1	1	NT	1	1	1	NT	1	1	1	NT	1

Bnbis	0	0	0	NT	1	0	0	NT	1	0	0	NT	1	0	0	NT	1
Cnbis	0	0	0	NT	1	0	0	NT	1	0	0	NT	1	0	0	NT	1
Dnbis	0	0	0	NT	1	1	1	NT	1	0	1	NT	0,5	1	0	NT	0,5
Enbis	0	0	0	NT	1	1	1	NT	1	0	0	NT	1	0	0	NT	1
Gn	0	0	0	NT	1	0	0	0	1	0	0	0	1	0	0	NT	1
Hn	0	0	0	NT	1	0	0	0	1	0	0	0	1	0	0	NT	1
In	0	0	0	NT	1	0	0	0	1	0	0	0	1	0	0	NT	1
Jn	0	0	0	NT	1	0	0	0	1	0	0	0	1	0	0	NT	1
Kn	0	0	0	NT	1	0	0	0	1	0	0	0	1	0	0	NT	1
Ln	0	0	0	NT	1	0	0	0	1	0	0	0	1	0	0	NT	1
Mn	0	0	0	NT	1	0	0	0	1	0	0	0	1	0	0	NT	1
Nn	0	0	0	NT	1	0	0	0	1	0	0	0	1	0	0	NT	1
On	0	0	0	NT	1	0	0	0	1	0	0	0	1	0	0	NT	1
Pn	0	0	0	NT	1	0	0	0	1	0	0	0	1	0	0	NT	1
Qn	0	0	0	NT	1	0	0	0	1	0	0	0	1	0	0	NT	1
Rn	0	0	0	NT	1	0	0	0	1	0	0	0	1	0	0	NT	1
Sn	0	0	0	0	1	0	0	0	1	0	0	0	1	0	0	0	1
Tn	0	0	0	NT	1	0	0	0	1	0	0	0	1	0	0	NT	1
Un	0	0	0	NT	1	0	0	0	1	0	0	0	1	0	0	NT	1
Vn	0	0	0	NT	1	0	0	NT	1	0	0	NT	1	0	0	NT	1
Wn	0	0	0	NT	1	0	0	NT	1	0	0	NT	1	0	0	NT	1
Xn	0	0	0	NT	1	0	0	NT	1	0	0	NT	1	0	0	NT	1
Yn	0	0	0	NT	1	0	0	NT	1	0	0	NT	1	0	0	NT	1
Zn	0	0	0	NT	1	0	0	NT	1	0	0	NT	1	1	0	NT	0,5
A1n	0	0	0	NT	1	0	0	NT	1	0	0	NT	1	0	0	NT	1
B1n	0	0	0	NT	1	0	0	NT	1	0	0	NT	1	0	0	NT	1
C1n	0	0	0	NT	1	0	0	NT	1	0	0	NT	1	0	0	NT	1

Critères	"Wang et al, 2015" ciblant le gène de la Spiraline	"Wang et, 2015" ciblant le Virus intégré	"Yokomi et al, 2008" ciblant le gène P58	"DVP LVS UBVO"
Vrai négatif	55	65	68	53
Vrai positif	49	51	52	52
Faux négatif	4	2	0	0
Faux positif	0	4	1	2
Inclusivité	92%	96%	100%	100%
Spécificité	100%	94%	99%	96%
Répétabilité	100%	98%	99%	98%

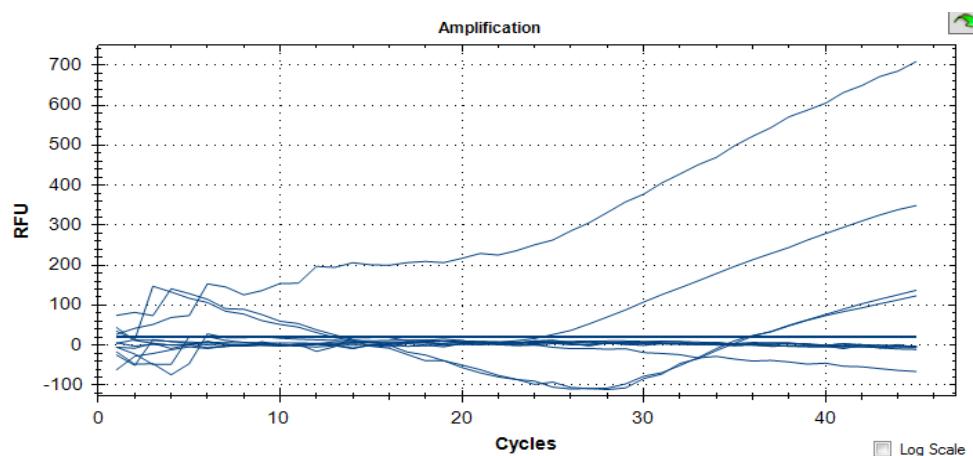


Les PCR « Wang et al, 2015 » ciblant le gène de la Spiraline et la PCR « Wang et al, 2015 » ciblant le virus intégré ne semblent pas inclusives pour deux souches californiennes (Np et Op). Les Ct obtenus pour ces deux échantillons avec la PCR « DVP LSV UBVO » sont tardifs (entre 38.16 et 39.19), preuve que les extraits d'ADN ne sont pas très concentrés. Il ne s'agirait donc pas d'un problème d'inclusivité mais d'un problème de sensibilité analytique. En effet ce sont les deux méthodes les moins sensibles, la concentration d'ADN devait donc être en dessous de leur seuil de détection. De plus, la PCR « Wang et al, 2015 » ciblant le gène du virus intégré n'est pas 100% spécifique, elle donne un résultat positif pour deux spiroplasmes, *Spiroplasma phoeniceum* et *Spiroplasma kunkelii* (cf. annexe 3). Cependant comme ces deux spiroplasmes sont deux pathogènes des plantes et cette méthode étant destinée à un usage en quarantaine, ce défaut de spécificité n'est pas nature à écarter l'usage de cette méthode comme méthode de première intention.

La PCR « Yokomi et al, 2008 » ciblant le gène putatif de l'adhésine P58 est 100% inclusive, elle obtient une spécificité de 99% avec un 1% correspondant à un pathogène des plantes [9] (*Spiroplasma phoeniceum*), cependant comme dit précédemment ce défaut de spécificité n'est pas nature à écarter l'usage de cette méthode comme méthode de première intention.

La PCR « DVP LSV UBVO » ciblant le gène putatif de l'adhésine P58 donne un résultat positif sur un échantillon non cible (*Fortunella japonica*), elle ne semble donc pas totalement spécifique. Etant donné les Ct obtenus et l'allure parfois atypique des courbes d'amplification avec la méthode (figure10), la déviation positive observée pour l'échantillon Zn est plus certainement liée à un problème de stabilité de la sonde Taqman® (bruit de fond du début) qu'à un problème de spécificité de la sonde par rapport à cette matrice. Cette méthode n'est donc pas adaptée pour une utilisation en routine.

Figure 10 : Exemple de courbes obtenues avec la PCR « DVP LSV UBVO »



Les résultats obtenus pour les échantillons allant de An à Fn ont parfois produit des résultats positifs, il s'agit d'ADN de bactéries du genre *Spiroplasma* (cf. tableaux 1 et 2), il y avait donc soit un problème de spécificité des méthodes vis-à-vis de ces échantillons soit un problème de contamination des échantillons par *Spiroplasma citri*. Une PCR conventionnelle a donc été réalisée pour pouvoir faire un séquençage sur les produits d'amplification afin de déterminer s'il s'agissait d'une contamination ou non. Après analyse du séquençage, il s'est avéré que les échantillons avaient été contaminés par *Spiroplasma citri*. Ces échantillons ont donc été retirés de l'étude (ils ne sont donc pas dans le tableau des résultats) et remplacés par de nouveaux échantillons (Bnbis, Cnbis, Dnbis et Enbis) qui ne sont pas contaminés (cf. tableau 2).

Voici l'exemple de l'analyse du séquençage de l'échantillon Cn :

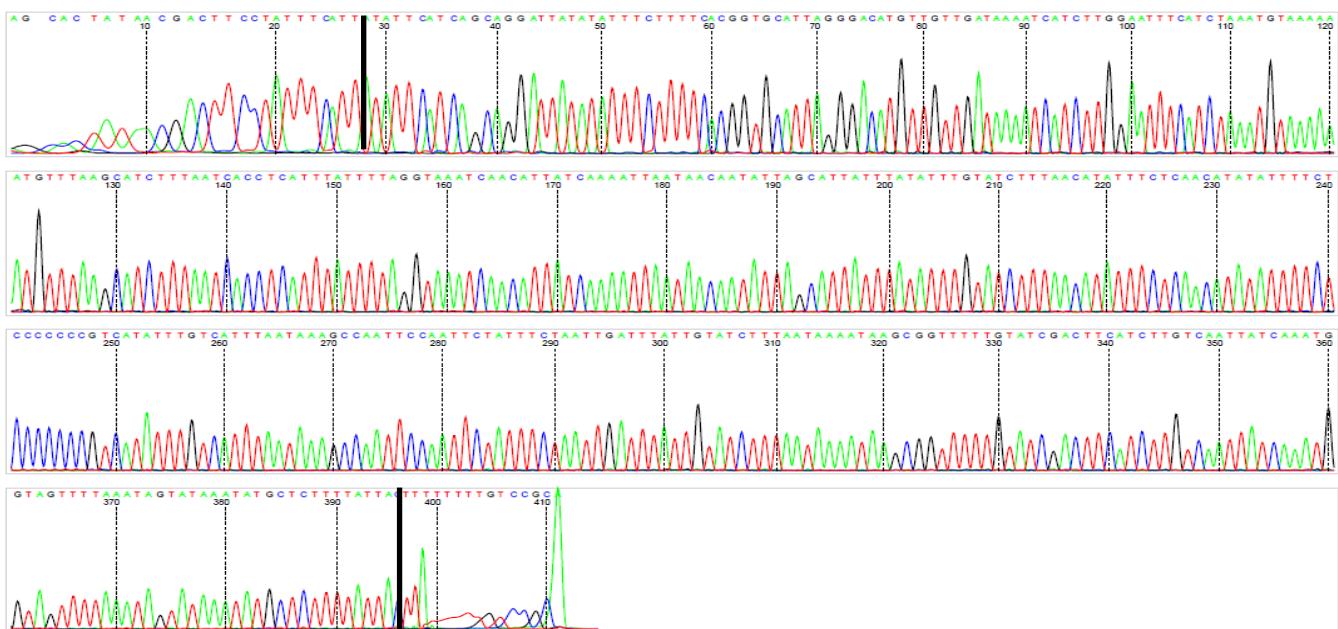
Les extraits ADN ont été amplifiés au LSV selon la méthode de Yokomi et al, 2008 ciblant le gène putatif de l'adhésine P58. Les amplifiât et les amorces ayant servis à l'amplification sont ensuite transmis à un prestataire de service qui réalisent un séquençage direct sur amplifiât. Le LSV reçoit les séquences produites (chromatogrammes et séquences) et les analyses. Le séquençage a été réalisé dans les deux sens, c'est-à-dire avec l'amorce « forward » et avec l'amorce « reverse », nous avons donc obtenu deux séquences. Les séquences sont analysées puis corrigées pour enlever les morceaux non interprétables et source d'erreur.

### Nº échantillon : Cn Amorces : P58-4R

Date de l'amplification : 26/05/16

Date et numéro du séquençage : 01/06/2016 CN\_P58-4R\_49

**Chromatogramme** copie d'écran du chromatogramme, les barres verticales signalent le début et la fin de la séquence analysable



### Séquence Surligner les corrections apportées à la séquence

```
>CN_P58-4R_49 status=Passed nucl=411 crlStart=1 crlStop=412 crlLen=412 order=COL16-072D
```

AGCACTATAACGACTTCCTATTCATTATATTCATCAGCAGGATTATATATTCTTACGGTGCATTAGGGACATGTTGTTGA  
TAAAATCATCTTGAATTCATCTAAATGTAAAAATGTTAACATCTTAAATCACCTCATTATTTAGGTAAATCAACATTA  
TCAAAATTAAACAATATTAGCATTATTTATTTGTATCTTAAACATATTTCTCAACATATTTCTCCCCCGTCATATT  
TGTCAATTAAAGCCAATTCCAATTCTATTCTAATTGATTATTGTATCTTAAATAAAATAAGCGGTTTGATCGACTTC  
ATCTTGTCAATTATCAAATGGTAGTTAAATAGTATAAAATGCTTTTATTACTTTTTTTGTCCGCA

### Séquence corrigée

```
>CN_P58-4R_49 COR
```

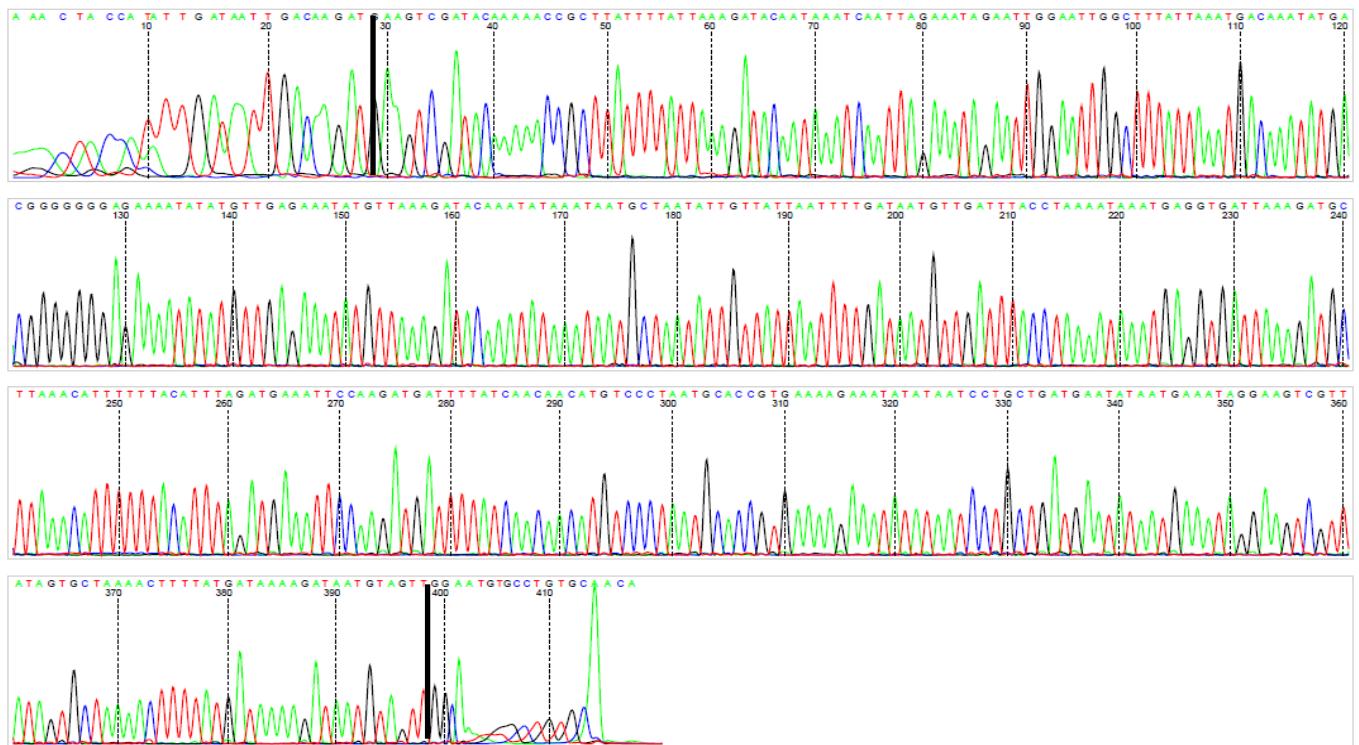
ATATTCATCAGCAGGATTATATATTCTTACGGTGCATTAGGGACATGTTGTTGATAAAATCATCTTGAATTCATCTAA  
TGTAAAAATGTTAACATCTTAAATCACCTCATTATTTAGGTAAATCAACATTCAAAATTAACAATATTAGCATT  
TTTATATTGTATCTTAAACATATTTCTCCCCCGTCATATTGTCAATTAAAGCCAATTCCAATT  
CTATTCTAATTGATTATTGTATCTTAAATAAAATAAGCGGTTTGATCGACTTCATCTTGTCAATTATCAAATGGTAGTT  
TAAATAGTATAAAATGCTTTTATTAC

## N° échantillon : Cn Amorces : P58-6F

Date de l'amplification : 26/05/2016

Date et numéro du séquençage : 01/06/2016 CN\_P58-6F\_50

**Chromatogramme** copie d'écran du chromatogramme , les barres verticales signalent le début et la fin de la séquence analysable



### Séquence Surligner les corrections apportées à la séquence

```
>CN_P58-6F_50 status=Passed nucl=417 crlStart=3 crlStop=417 crlLen=415 order=COL16-072D
aaACTACCATATTGATAATTGACAAGATGAAGTCGATACAAAAACCGCTTATTTATTAAAGATACAATAATCAATTAGAAATA
GAATTGGAATTGGCTTATTAAATGACAATATGACGGGGGGGAGAAAATATGTTGAGAAATATGTTAAAGATACAATATAA
ATAATGCTAATATTGTTATTAAATTTGATAATGTTGATTACCTAAATAGAGGTGATTAAAGATGCTAACATTTTAC
ATTAGATGAAATTCCAAGATGATTATCAACACATGTCCTAATGCACCGTGAAAAGAAATATATAATCCTGCTGATGAATA
TAATGAAATAGGAAGTCGTTAGTGCTAAACTTTATGATAAAAGATAATGTAGTTGGAATGTGCCTGTGCAACA
```

### Séquence corrigée

```
>CN_P58-6F_50 COR
GAAGTCGATACAAAAACCGCTTATTTATTAAAGATACAATAATCAATTAGAAATAGAATTGGAATTGGCTTATTAAATGACA
AATATGACGGGGGGGAGAAAATATGTTGAGAAATATGTTAAAGATACAATATAAAATGCTAATATTGTTATTAAATTTGA
TAATGTTGATTACCTAAATAGAGGTGATTAAAGATGCTAACATTTTACATTAGATGAAATTCCAAGATGATTGTTA
TCAACAAACATGTCCTAATGCACCGTGAAAAGAAATATATA
```

Un contig est ensuite réalisé, il s'agit d'une séquence génomique continue et ordonnée, générée par l'assemblage de deux séquences qui se chevauchent.[2]

>Contig1

TGCGGACAAAAAAAGTAATAAAGAGCATATTACTATTTAAACTACCATTGATAATTGACAAGATGAAGTCGATACAAAACCGCTTA  
TTTATTAAAGATACAATAATCAATTAGAAATAGAATTGGAATTGGCTTTATTAATGACAAATATGACGGGGGGGAGAAAATATATGTTGAG  
AAATATGTTAAAGATACAATAATGCTAATATTGTTATTAATTTGATAATGTTGATTACCTAAATAATGAGGTGATTAAAGATG  
CTTAAACATTTTACATTTAGATGAAATTCAAGATGATTTCACAAACATGCCCTAACGCACCGTGAAAGAAATATATAATCCTGCTG  
ATGAATATAATGAAATAGGAAGTCGTTAGTGCTAAACTTTATGATAAAAGATAATGTTGGAATGTCCTGTGCAACA

Ce « contig » est ensuite comparé grâce à l'outil BLASTn, aux séquences disponibles dans une base de données publique (ici NCBI). Nous obtenons un pourcentage d'homologie, dans ce cas, la séquence obtenue à 98% d'homologie avec une séquence de *Spiroplasma citri*.

Sequences producing significant alignments:

Select: All None Selected: 0

Alignments						
	Description	Max score	Total score	Query cover	E value	Ident Accession
<input type="checkbox"/>	<a href="#">Spiroplasma citri GII3-3X chromosome, contig Contig06</a>	795	795	98%	0.0	98% AM285307.1
<input type="checkbox"/>	<a href="#">Spiroplasma citri strain BR3-3X putative adhesin gene, partial cds</a>	774	774	98%	0.0	98% DQ344812.1
<input type="checkbox"/>	<a href="#">Spiroplasma citri strain T9 P58 6/4 putative adhesin gene, partial cds</a>	728	728	88%	0.0	99% EU602314.1
<input type="checkbox"/>	<a href="#">Spiroplasma citri strain T4 P58 6/4 putative adhesin gene, partial cds</a>	726	726	88%	0.0	99% EU602315.1
<input type="checkbox"/>	<a href="#">Spiroplasma citri chromosome pre-inversion border, SPV1-like sequences, transposase gene, partial cds, adhesin-like protein P58 gene, complete cds</a>	710	710	95%	0.0	96% U44405.1

Figure 11 : Capture d'écran du résultat donné par la base de données

## Conclusion / discussion

La caractérisation des méthodes permet de montrer que les performances de la méthode de « Yokomi et al, 2008» ciblant le gène putatif de l'adhésine P58 sont meilleures que les trois autres PCR en temps réel. En effet, cette méthode est la plus sensible, critère important, car la plupart du temps les plantes en quarantaine sont asymptomatiques. Elle arrive à détecter l'ensemble des isolats testés, elle possède une inclusivité de 100%. Cependant, elle n'est pas totalement spécifique à *Spiroplasma citri*, elle détecte également *Spiroplasma phoeniceum*. Cependant comme ce spiroplasme est un pathogène des plantes et cette méthode étant destinée à un usage en quarantaine, ce défaut de spécificité n'est pas nature à écarter l'usage de cette méthode comme méthode de première intention. De plus, *Spiroplasma phoeniceum* n'a été retrouvé que sur pervenche en Syrie (Saillard et al, 1987), donc si un résultat positif sort sur rutacée il y a peu de risque que cela soit ce spiroplasme.

La méthode « Wang et al, 2015 » ciblant le virus intégré pourrait être utilisée en méthode de confirmation d'un premier résultat positif car cette méthode a une spécificité de 100% pour *Spiroplasma citri*. Il serait intéressant de caractériser les méthodes de PCR en point final, celle-ci pourrait également servir de méthode de confirmation si l'unité de quarantaine obtient un résultat positif. Il faudrait, dans l'idéal, une méthode de PCR conventionnelle ciblant une autre zone du génome de *Spiroplasma citri*, car cela conforterait encore plus le résultat positif obtenu.

Il serait également possible d'isoler la bactérie dans un cas de résultat de PCR positif à des fins de confirmation. La PCR ne permet pas de dire si la bactérie est viable dans la plante, elle ne permet que de déceler la présence d'ADN. Ainsi la culture pourrait être une bonne solution pour déterminer la viabilité du micro-organisme dans la plante.

La méthode suggérée pour la détection de *Spiroplasma citri* n'est pas encore totalement caractérisée. En effet la méthode destinée à l'unité de quarantaine doit être reproductible pour garantir une concordance des résultats dans des conditions d'utilisation pouvant différer (suivi métrologique des équipements et matériels, marques de réactifs ou consommables, ...). La reproductibilité est l'étroitesse d'accord entre des résultats d'essais individuels effectués sur un matériau d'essai identique en utilisant la même méthode et obtenus par des opérateurs de différents laboratoires utilisant un équipement différent. La méthode étant destinée à une autre unité du LSV, un EILV (essai inter laboratoire de validation) doit être organisé.

Sur le plan personnel, ce stage m'a permis de me familiariser avec les démarches à entreprendre afin de caractériser une méthode. J'ai pu approfondir mes connaissances en biologie moléculaire. Ce stage au Laboratoire de la santé des végétaux a répondu à mes attentes et m'a permis de découvrir un nouvel environnement professionnel, j'ai pu découvrir le travail en laboratoire mais aussi le travail au bureau où j'ai pu travailler mes capacités de synthèse lors de la rédaction de ce rapport.

# Bibliographies

[1] Anses- Agence nationale de sécurité sanitaire de l'alimentation, de l'environnement et du travail.  
Adresse URL : [www.anses.fr](http://www.anses.fr), (consulté le 15 avril 2016)

[2] Documents internes au LSV

[3] OEPP, CABI, Fiche informative sur les organismes de quarantaine *Spiroplasma citri*

[4] Mabilleau F, Lak-Hal A , Goven D, Rappels de base en biologie moléculaire et amplification génique par PCR

[5] Yokomi RK, Mello AFS, Saponari M and Fletcher J, 2008. Polymerase chain reaction-based detection of *Spiroplasma citri* associated with citrus stubborn disease. *Plant Disease*, 92, 253–260.

[6] Lee IM, Bottner KD, Munyaneza JE, Davis RE, Crosslin JM, Du Toit LJ, Crosby T., 2006. Carrot purple leaf: a new spiroplasmal disease associated with carrots in Washington State. *Plant Dis* **90**:989–993.

[7] Khanchezar A, Izadpanah K and Salehi M, 2012. Partial characterization of *Spiroplasma citri* isolates associated with necrotic yellows disease of safflower in Iran. *Journal of Phytopathology*, 160, 331–336.

[8] Wang, X., Doddapaneni, H., Chen, J., & Yokomi, R. K., 2015. Improved real-time PCR diagnosis of citrus stubborn disease by targeting prophage genes of *Spiroplasma citri*. *Plant Disease*, 99(1), 149-154.

[9] Guide de caractérisation des critères de performances des méthodes qualitatives. V02b – novembre 2012.

[10] [http://www.baua.de/de/Themen-von-A-Z/Biologische-Arbeitsstoffe/TRBA/pdf/TRBA\\_466.pdf?\\_\\_blob=publicationFile&v=7](http://www.baua.de/de/Themen-von-A-Z/Biologische-Arbeitsstoffe/TRBA/pdf/TRBA_466.pdf?__blob=publicationFile&v=7) (consulté le 15 juin 2016)

# Table des illustrations

Figure 1 : <i>S. citri</i> dans les tubes de la sève de pervenche inoculée par greffage ( <i>Catharanthus roseus</i> ) (INRA, Bordeaux) x8000 .....	3
Figure 2 : Symptômes de <i>S. citri</i> sur agrumes (J.-M. Bové, INRA Bordeaux) .....	4
Figure 3 : Principe de la PCR en temps réel avec une sonde de type Taqman® .....	10
Figure 4 : Principe de la PCR en temps réel avec du SybrGreen .....	11
Figure 5 : Exemple de courbe de fusion.....	11
Figure 6 : Photo du gel d'électrophorèse après révélation (première approche) .....	15
Figure 7 : Photo du gel d'électrophorèse après révélation Lee et al. 2006 (ciblant le virus intégré).....	17
Figure 8 : Photo du gel d'électrophorèse après révélation Yokomi et al. 2008 (ciblant le gène P58) .....	17
Figure 9 : Photo du gel d'électrophorèse après révélation Khancherzar et al. 2012 (ciblant le gène pE) .....	17
Figure 10 : Exemple de courbes obtenues avec la PCR « DVP LSV UBVO ».....	22
Figure 11 : Capture d'écran du résultat donné par la base de données .....	25

# Table des tableaux

Tableau 1 : Référence des échantillons cibles.....	6
Tableau 2 : Référence des échantillons non cibles .....	7
Tableau 3 : Méthodes de PCR conventionnelles testées permettant la détection de <i>S. Citri</i> .....	9
Tableau 4 : Méthodes de PCR en temps réel testées permettant la détection de <i>S. Citri</i> .....	12
Tableau 5 : Oligos de PCR en temps réel dessinés pour cette étude et permettant la détection de <i>S. citri</i> .....	12
Tableau 6 : Résultats des premiers essais des PCR conventionnelles .....	15
Tableau 7 : Résultats des premiers essais des PCR en temps réel .....	16
Tableau 8 : Tm obtenus pour les PCR en temps réel utilisant le SybrGreen .....	16
Tableau 9 : Résultats de l'étude préliminaire pour les PCRs .....	18
Tableau 10 : Résultats de l'étude préliminaire pour les qPCR .....	18
Tableau 11 : Résultats de la sensibilité analytique pour la PCR « Wang et al, 2015 » ciblant le virus intégré ..	19
Tableau 12 : Résultats de la sensibilité analytique pour la PCR « Wang et al, 2015 » ciblant le gène de la Spiraline .....	19
Tableau 13 : Résultats de la sensibilité analytique pour la PCR « Yokomi et al, 2008 » ciblant le gène P58.....	20
Tableau 14 : Résultats de la sensibilité analytique pour la PCR « LSV DVP UBVO » ciblant le gène P58 .....	20

## RÉSUMÉ

*Spiroplasma citri* est une bactérie du phloème responsable du « stubborn » des agrumes. Elle provoque de nombreux dégâts et une baisse des rendements importante avec des fruits petits et mal formés. Elle fait donc l'objet d'une directive européenne, et tous les végétaux de la famille des rutacées doivent être contrôlés à leur entrée en France pour vérifier qu'ils ne sont pas porteur de ce pathogène. Afin de répondre à ce besoin réglementaire, il est nécessaire de disposer de méthodes fiables et performantes. L'unité BVO et l'unité de quarantaine du laboratoire de la santé des végétaux ont souhaité évaluer les méthodes de détection de cette bactérie. L'objet des travaux présentés dans ce rapport est la caractérisation des méthodes de détection de *S. citri* par amplification génique. Sur la base d'une étude bibliographique recensant ces méthodes, des méthodes ont été sélectionnées pour être testées. A l'issu des essais préliminaires, quelques méthodes ont été retenues pour être entièrement caractérisées. La caractérisation des méthodes a pu montrer que la méthode « Yokomi et al, 2008» ciblant le gène putatif de l'adhésine P58 est la plus performante.

mots-clés : *Spiroplasma citri*, caractérisation, amplification génique

## ABSTRACT

*Spiroplasma citri* is a bacterium to the plant's phloem which is associated with the « stubborn » disease. This disease affects *citrus*. It causes extensive damage and lower yields with smaller fruits. It is the subjects of a European directive and all rutaceae incoming in France must be controlled to check that they are not carry this pathogen. To meet this regulatory requirement, it is necessary to have reliable and efficient methods. The BVO unit and the quarantine unit of the Plant Health Laboratory wished to assess methods of detection of this bacterium. The purpose of the work presented in this report is the characterization of *S. citri* detection methods by gene amplification. Based on a literature review, methods were selected to be tested. At the end of the preliminary tests, some methods have been selected to be fully characterized. The characterization methods shows that the "Yokomi et al, 2008" method targeting the putative adhesin gene P58 is the most effective.

keywords : *Spiroplasma citri*, characterization, gene amplification

# ENGAGEMENT DE NON PLAGIAT

Je, soussigné(e) .....  
déclare être pleinement conscient(e) que le plagiat de documents ou d'une  
partie d'un document publiée sur toutes formes de support, y compris l'internet,  
constitue une violation des droits d'auteur ainsi qu'une fraude caractérisée.  
En conséquence, je m'engage à citer toutes les sources que j'ai utilisées  
pour écrire ce rapport ou mémoire.

signé par l'étudiant(e) le 28 / 06 / 2016

**Cet engagement de non plagiat doit être signé et joint  
à tous les rapports, dossiers, mémoires.**

Présidence de l'université  
40 rue de rennes – BP 73532  
49035 Angers cedex  
Tél. 02 41 96 23 23 | Fax 02 41 96 23 00



Annexe 1 : mélange réactionnel et cycles d'amplification

PCR Conventionnelle : « Yokomi et al, 2008 » ciblant le gène P58

MELANGE REACTIONNEL						
Réactifs	N° lot	[Sol. mère]	[Souhaitée]	Vol. d'un tube	Nb. de tube	Vol. du mix
Eau ultra pure				14,00 µL		0,0 µL
MgCl <sub>2</sub>		25 mM	1 mM	1,00 µL		0,0 µL
dNTP		20 mM	0,2 mM	0,25 µL		0,0 µL
Amorce P58-6f		10 µM	0,5 µM	1,25 µL	3	0,0 µL
Amorce P58-4r		10 µM	0,5 µM	1,25 µL		0,0 µL
GoTaq® G2 Hot Start Polymerase		5 u/µL	0,05 u	0,25 µL		0,0 µL
5X Green or Colorless GoTaq®		5 X	1 X	5,00 µL		0,0 µL
		Volume Mix PCR		23 µL		
		Volume échantillon		2 µL		
		Volume total par puit		25 µL		

Si utilisé, préciser la nature et/ou la référence du kit ou mastermix:

GoTaq® G2 Hot Start Polymerase

AMPLIFICATION (décrire le ou les cycle(s) nécessaire(s))

Dénaturation :	95 °C	2 minutes	NI du thermocycleur utilisé :
Dénaturation :	95 °C	30 secondes	
Hybridation :	56 °C	30 secondes	40 CYCLES
Elongation :	72 °C	1 minute	
Elongation :	72 °C	5 minutes	
Maintien à 15°C			

PCR Conventionnelle : « Lee et al, 2006 » ciblant le virus intégré

MELANGE REACTIONNEL						
Réactifs	N° lot	[Sol. mère]	[Souhaitée]	Vol. d'un tube	Nb. de tube	Vol. du mix
Eau ultra pure				14,50 µL		43,5 µL
MgCl <sub>2</sub>		25 mM	1 mM	1,00 µL		3,0 µL
dNTP		20 mM	0,2 mM	0,25 µL		0,8 µL
Amorce RFP3		10 µM	0,4 µM	1,00 µL	3	3,0 µL
Amorce RFM3		10 µM	0,4 µM	1,00 µL		3,0 µL
GoTaq® G2 Hot Start Polymerase		5 u/µL	0,05 u	0,25 µL		0,8 µL
5X Green or Colorless GoTaq®		5 X	1 X	5,00 µL		15,0 µL
		Volume Mix PCR		23 µL		
		Volume échantillon		2 µL		
		Volume total par puit		25 µL		69 µL

Si utilisé, préciser la nature et/ou la référence du kit ou mastermix:

GoTaq® G2 Hot Start Polymerase

AMPLIFICATION (décrire le ou les cycle(s) nécessaire(s))

Dénaturation :	95 °C	2 minutes	NI du thermocycleur utilisé :
Dénaturation :	94 °C	1 minutes	
Hybridation :	55 °C	2 minutes	38 CYCLES
Elongation :	72 °C	3 minutes	
Elongation :	72 °C	5 minutes	
Maintien à 15°C			

PCR Conventionnelle « Khanchezar et al, 2012 » ciblant le gène pE

MELANGE REACTIONNEL						
Réactifs	N° lot	[Sol. mère]	[Souhaitée]	Vol. d'un tube	Nb. de tube	Vol. du mix
Eau ultra pure				14,50 µL		0,0 µL
MgCl <sub>2</sub>		25 mM	1 mM	1,00 µL		0,0 µL
dNTP		20 mM	0,2 mM	0,25 µL		0,0 µL
Amorce Scif		10 µM	0,4 µM	1,00 µL	3	0,0 µL
Amorce Scir		10 µM	0,4 µM	1,00 µL		0,0 µL
GoTaq® G2 Hot Start Polymerase		5 u/µL	0,05 u	0,25 µL		0,0 µL
5X Green or Colorless GoTaq®		5 X	1 X	5,00 µL		0,0 µL
		Volume Mix PCR		23 µL		
		Volume échantillon		2 µL		
		Volume total par puit		25 µL		0 µL

Si utilisé, préciser la nature et/ou la référence du kit ou mastermix:

GoTaq® G2 Hot Start Polymerase

AMPLIFICATION (décrire le ou les cycle(s) nécessaire(s))

Dénaturation :	95 °C	2 minutes	NI du thermocycleur utilisé :
Dénaturation :	94 °C	30 secondes	
Hybridation :	54 °C	40 secondes	35 CYCLES
Elongation :	72 °C	1 minute	
Elongation :	72 °C	5 minutes	
Maintien à 15°C			

PCR Conventionnelle : « Yokomi et al, 2008 » ciblant le gène P89

MELANGE REACTIONNEL						
Réactifs	N° lot	[Sol. mère]	[Souhaitée]	Vol. d'un tube	Nb. de tube	Vol. du mix
Eau ultra pure				14,00 µL		0,0 µL
MgCl <sub>2</sub>		25 mM	1 mM	1,00 µL		0,0 µL
dNTP		20 mM	0,2 mM	0,25 µL		0,0 µL
Amorce P89f		10 µM	0,5 µM	1,25 µL	3	0,0 µL
Amorce P89r		10 µM	0,5 µM	1,25 µL		0,0 µL
Go Taq® G2 Hot Start Polymerase		5 u/µL	0,05 u	0,25 µL		0,0 µL
5X Green or Colorless Go Taq®		5 X	1 X	5,00 µL		0,0 µL
Volume Mix PCR				23 µL		0 µL
Volume échantillon				2 µL		
Volume total par puit				25 µL		

Si utilisé, préciser la nature et/ou la référence du kit ou mastermix:

Go Taq® G2 Hot Start Polymerase

AMPLIFICATION (décrire le ou les cycle(s) nécessaire(s))

Dénaturation :	95 °C	2 minutes	NI du thermocycleur utilisé :
Dénaturation :	95 °C	30 secondes	
Hybridation :	56 °C	30 secondes	40 CYCLES
Elongation :	72 °C	1 minute	
Elongation :	72 °C	5 minutes	
Maintien à 15°C			

PCR Conventionnelle : « Saillard » ciblant le gène de la spiraline

MELANGE REACTIONNEL						
Réactifs	N° lot	[Sol. mère]	[Souhaitée]	Vol. d'un tube	Nb. de tube	Vol. du mix
Eau ultra pure				16,00 µL		0,0 µL
MgCl <sub>2</sub>		25 mM	1 mM	1,00 µL		0,0 µL
dNTP		20 mM	0,2 mM	0,25 µL		0,0 µL
Amorce SC1		10 µM	0,1 µM	0,25 µL	3	0,0 µL
Amorce SC1'		10 µM	0,1 µM	0,25 µL		0,0 µL
Go Taq® G2 Hot Start Polymerase		5 u/µL	0,05 u	0,25 µL		0,0 µL
5X Green or Colorless Go Taq®		5 X	1 X	5,00 µL		0,0 µL
Volume Mix PCR				23 µL		0 µL
Volume échantillon				2 µL		
Volume total par puit				25 µL		

Si utilisé, préciser la nature et/ou la référence du kit ou mastermix:

Go Taq® G2 Hot Start Polymerase

AMPLIFICATION (décrire le ou les cycle(s) nécessaire(s))

Dénaturation :	95 °C	2 minutes	NI du thermocycleur utilisé :
Dénaturation :	92 °C	45 secondes	
Hybridation :	60 °C	45 secondes	40 CYCLES
Elongation :	72 °C	1 minute	
Elongation :	72 °C	5 minutes	
Maintien à 15°C			

PCR en temps réel : « Wang et al, 2015 » ciblant le virus intégré SpV1-ORF1

MELANGE REACTIONNEL						
Réactifs	N° lot	[Sol. mère]	[Souhaitée]	Vol. d'un tube	Nb. de tube	Vol. du mix
Eau ultra pure				23 µL		0 µL
Power SYBR Green PCR Master Mix	2	X	1 X	0 µL		0 µL
Amorce Php-orf1-F	10	µM	0,2 µM	0 µL		0 µL
Amorce Php-orf1-R	10	µM	0,2 µM	0 µL		0 µL
			Volume Mix PCR	23 µL		
			Volume échantillon	2 µL		
			Volume total par puit	25 µL		

Si utilisé, préciser la nature et/ou la référence du kit ou mastermix:

Power SYBR Green PCR Master Mix

AMPLIFICATION (décrire le ou les cycle(s) nécessaire(s))

NI du thermocycleur utilisé :

Pré-incubation:	95°C	10 minutes	
Dénaturation:	95°C	20 secondes	35 CYCLES
Hybridation/Elongation:	59°C	1 minute	
Melting curve:	59 à 95°C	1% en continu	

PCR en temps réel : « Wang et al, 2015 » ciblant le virus intégré SpV1-ORF3

MELANGE REACTIONNEL						
Réactifs	N° lot	[Sol. mère]	[Souhaitée]	Vol. d'un tube	Nb. de tube	Vol. du mix
Eau ultra pure				23 µL		0 µL
Power SYBR Green PCR Master Mix	2	X	1 X	0 µL		0 µL
Amorce Php-orf3-F	10	µM	0,2 µM	0 µL		0 µL
Amorce Php-orf3-R	10	µM	0,2 µM	0 µL		0 µL
			Volume Mix PCR	23 µL		
			Volume échantillon	2 µL		
			Volume total par puit	25 µL		

Si utilisé, préciser la nature et/ou la référence du kit ou mastermix:

Power SYBR Green PCR Master Mix

AMPLIFICATION (décrire le ou les cycle(s) nécessaire(s))

NI du thermocycleur utilisé :

Pré-incubation:	95°C	10 minutes	
Dénaturation	95°C	20 secondes	35 CYCLES
Hybridation/Elongation	59°C	1 minute	
Melting curve	59 à 95°C	1% en continu	

PCR en temps réel : « Wang et al, 2015 » ciblant le gène de la Spiraline

MELANGE REACTIONNEL						
Réactifs	N° lot	[Sol. mère]	[Souhaitée]	Vol. d'un tube	Nb. de tube	Vol. du mix
Eau ultra pure				23 µL		0 µL
Power SYBR Green PCR Master Mix	2	X	1 X	0 µL		0 µL
Amorce Spiralin-F	10	µM	0,2 µM	0 µL		0 µL
Amorce Spiralin-R	10	µM	0,2 µM	0 µL		0 µL
			Volume Mix PCR	23 µL		
			Volume échantillon	2 µL		
			Volume total par puit	25 µL		

Si utilisé, préciser la nature et/ou la référence du kit ou mastermix:

Power SYBR Green PCR Master Mix

AMPLIFICATION (décrire le ou les cycle(s) nécessaire(s))

NI du thermocycleur utilisé :

Pré-incubation:	95°C	10 minutes	
Dénaturation:	95°C	20 secondes	35 CYCLES
Hybridation/Elongation:	59°C	1 minute	
Melting curve:	59 à 95°C	1% en continu	

Il s'agit du même mélange réactionnel et de la même amplification pour la PCR « Wang et al, 2015 » ciblant le gène de la Spiraline avec amorce dégénérée sauf que l'amorce Spiraline-R est remplacée par une amorce Spiraline-Rdeg.

PCR en temps réel : « Yokomi et al, 2008 » ciblant le gène P58

MELANGE REACTIONNEL						
Réactifs	N° lot	[Sol. mère]	[Souhaitée]	Vol. d'un tube	Nb. de tube	Vol. du mix
Eau ultra pure				23 µL		0 µL
Power SYBR Green PCR Master Mix	2	X	1 X	0 µL		0 µL
Amorce P58-3f	10	µM	0,8 µM	0 µL		0 µL
Amorce P58-4r	10	µM	0,8 µM	0 µL		0 µL
			Volume Mix PCR	23 µL		0 µL
			Volume échantillon	2 µL		
			Volume total par puit	25 µL		

Si utilisé, préciser la nature et/ou la référence du kit ou mastermix:

Power SYBR Green PCR Master Mix

AMPLIFICATION (décrire le ou les cycle(s) nécessaire(s))

NI du thermocycleur utilisé :

Pré-incubation:	95°C	10 minutes	
Dénaturation:	95°C	15 secondes	45 CYCLES
Hybridation/ Elongation:	61°C	1 minute	

Melting curve: 60 à 95°C 1% en continu

PCR en temps réel : « DVP LSV UBVO » avec sonde ciblant le gène P58 avec amores dégénérées

MELANGE REACTIONNEL						
Réactifs	N° lot	[Sol. mère]	[Souhaitée]	Vol. d'un tube	Nb. de tube	Vol. du mix
Eau ultra pure				23 µL		0 µL
Taqman mastermix PCR	2	X	1 X	0 µL		0 µL
Amorce P58-3fdeg	10	µM	0,8 µM	0 µL		0 µL
Amorce P58-4rdeg	10	µM	0,8 µM	0 µL		0 µL
sonde ScP58-p	10	µM	0,4 µM	0 µL		0 µL
			Volume Mix PCR	23 µL		0 µL
			Volume échantillon	2 µL		
			Volume total par puit	25 µL		

Si utilisé, préciser la nature et/ou la référence du kit ou mastermix:

Taqman® Universal PCR Master Mix, No Amperase® UNG (Applied Biosystems)

AMPLIFICATION (décrire le ou les cycle(s) nécessaire(s))

NI du thermocycleur utilisé :

Activation Taq	95 °C	10 min	
Nombre de cycles :	45		
Dénaturation	95 °C	15 s	
Hybridation/Elongation	60 °C	1 min	

PCR en temps réel : « DVP LSV UBVO » avec sonde ciblant le gène P58 avec amores non dégénérées

MELANGE REACTIONNEL						
Réactifs	N° lot	[Sol. mère]	[Souhaitée]	Vol. d'un tube	Nb. de tube	Vol. du mix
Eau ultra pure				23 µL		0 µL
Taqman mastermix PCR	2	X	1 X	0 µL		0 µL
Amorce P58-3f	10	µM	0,8 µM	0 µL		0 µL
Amorce P58-4r	10	µM	0,8 µM	0 µL		0 µL
sonde ScP58-p	10	µM	0,4 µM	0 µL		0 µL
			Volume Mix PCR	23 µL		0 µL
			Volume échantillon	2 µL		
			Volume total par puit	25 µL		

Si utilisé, préciser la nature et/ou la référence du kit ou mastermix:

Taqman® Universal PCR Master Mix, No Amperase® UNG (Applied Biosystems)

AMPLIFICATION (décrire le ou les cycle(s) nécessaire(s))

NI du thermocycleur utilisé :

Pré-incubation:	95°C	10 minutes	
Dénaturation:	95°C	15 secondes	45 CYCLES
Hybridation/ Elongation:	61°C	1 minute	

Annexe 2 : Résultats plus détaillés de l'étude préliminaire pour les qPCR

		Wang et al. 2015 (virus intégré)		Wang et al. 2015 (Spiraline)		Wang et al. 2015 (Spiraline avec amorce deg )		Yokomi et al. 2008 (P58)		DVP LSV UBVO Sonde et amorces P58-3f/P58-4r
		72,88 ±0,03		75,29±0,15		75,26±0,19		73,52±0,24		
		Ct	Tm	Ct	Tm	Ct	Tm	Ct	Tm	Ct
Inclusivité	Ap	11,18	72,86	12,01	75,30	11,94	75,33	10,53	73,71	14,32
	Bp	9,98	72,89	12,04	75,33	12,19	75,33	8,77	73,71	-
	Cp	9,89	72,89	13,52	75,33	13,01	75,34	11,28	73,71	14,36
	Ep	11,61	72,88	15,07	75,36	14,79	75,36	7,60	73,72	11,16
	Fp	11,60	72,92	12,36	75,38	12,25	75,38	11,90	73,28	14,40
	Gp	-		12,95	75,38	12,89	75,11	11,57	73,76	14,82
	Hp	-		10,07	75,15	8,69	75,11	10,05	73,30	12,52
Sensibilité	Qp	+		+		+		+		+
	Qp'	+		+		+		+		+
	Qp''	+		-		-		+		+
	Qp'''	-		-		-		+		+
	Qp''''	-		-		-		-		+
	Qp'''''	-		-		-		-		-

Annexe 3 : Classification de procaryotes dans les groupes à risque (<http://www.baua.de/de/Themen-von-A-Z/Biologische-Arbeitsstoffe/TRBA/pdf/TRBA>)

Le « p » correspond au pathogène chez les plantes

Le « n » correspond au pathogène pour le non vertébrés

Le « n2 » correspond au pathogène pour le non vertébrés et des mesures de sécurité doivent être prises

Le « neu » correspond à « Nouvellement inclus dans les espèces de la liste de classification »

Le « umb » correspond au renommage taxonomique

Le « t » correspond au pathogènes pour les vertébrés

Spezies	Risiko-gruppe	Bemer-kungen	Status
<i>Spirochaeta litoralis</i>	1		
<i>Spirochaeta perfilievii</i>	1		neu
<i>Spirochaeta plicatilis</i>	1		
<i>Spirochaeta smaragdinae</i>	1		
<i>Spirochaeta sphaeroplastigenens</i>	1		neu
<i>Spirochaeta stenostrepta</i> → <i>Treponema stenostrepta</i>			Umb.
<i>Spirochaeta thermophila</i>	1		
<i>Spirochaeta zuelzerae</i> → <i>Treponema zuelzerae</i>			Umb.
<b><i>Spiroplasma</i></b>			
<i>Spiroplasma alleghenense</i>	1		
<i>Spiroplasma apis</i>	1	n	
<i>Spiroplasma atrichopogonis</i>	1		
<i>Spiroplasma cantharicola</i>	1		
<i>Spiroplasma chinense</i>	1		
<i>Spiroplasma chrysopicola</i>	1		
<i>Spiroplasma citri</i>	1	p	
<i>Spiroplasma clarkii</i>	1		
<i>Spiroplasma corruscae</i>	1		
<i>Spiroplasma culicicola</i>	1		
<i>Spiroplasma diabroticae</i>	1		
<i>Spiroplasma diminutum</i>	1		
<i>Spiroplasma eriocheiris</i>	1	n2	neu
<i>Spiroplasma floricola</i>	1		
<i>Spiroplasma gladiatoris</i>	1		
<i>Spiroplasma helicoides</i>	1		
<i>Spiroplasma insolitum</i>	1		
<i>Spiroplasma ixodetis</i>	1		
<i>Spiroplasma kunkelii</i>	1	p	
<i>Spiroplasma lampyridicola</i>	1		
<i>Spiroplasma leptinotarsae</i>	1		
<i>Spiroplasma leucomiae</i>	1	n	
<i>Spiroplasma lineolae</i>	1		
<i>Spiroplasma litorale</i>	1		
<i>Spiroplasma melliferum</i>	1	n	
<i>Spiroplasma mirum</i>	2	t	
<i>Spiroplasma monobiae</i>	1		
<i>Spiroplasma montanense</i>	1		
<i>Spiroplasma penaei</i>	1	n2	
<i>Spiroplasma phoeniceum</i>	1	p	
<i>Spiroplasma platyhelix</i>	1		
<i>Spiroplasma poulsonii</i>	1	n	
<i>Spiroplasma sabaudiense</i>	1		
<i>Spiroplasma syrphidicola</i>	1		
<i>Spiroplasma tabanidicola</i>	1		