

Méthode d'analyse en nématologie

RÉFÉRENCE : ANSES/LSV/MA079- Version 01

Octobre 2024

Identification de *Nacobbus aberrans* par analyse biomoléculaire

Laboratoire de la santé de végétaux

Laboratoire national de référence « Nématodes phytopathogènes* »

*tous nématodes sauf exceptions mentionnées dans l'arrêté ministériel en vigueur désignant les laboratoires nationaux de référence dans le domaine de la santé publique phytosanitaire

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 2024	Version initiale

* La version 01 a fait l'objet d'une consultation du 26/09/2024 au 11/10/2024 sur le site internet de l'Agence, notamment auprès des laboratoires agréés français.

Avant-propos

La présente méthode a été optimisée et validée par :

Anses - Laboratoire de la santé des végétaux – Unité de nématologie

Laboratoire National de Référence : « **Nématodes phytopathogènes^{*1}** »

Adresse : Domaine de la Motte au Vicomte, BP 35327, 35653 LE RHEU Cedex, France

Contact : rennes.lsv@anses.fr

¹ tous nématodes sauf exceptions mentionnées dans l'arrêté ministériel en vigueur désignant les laboratoires nationaux de référence dans le domaine de la santé publique phytosanitaire

Sommaire

Avant-propos	3
Introduction	5
Avertissements et précautions de sécurité	6
Objet et domaine d'application	7
1. Documents de référence	7
2. Termes, sigles et définitions	7
3. Principe de la méthode	8
4. Réactifs et consommables	8
4.1 Tampon d'extraction	9
4.2 Mastermix et oligonucléotides	9
4.3 Consommables divers	10
5. Appareillage et matériels	10
6. Échantillons	11
6.1 Conditions d'acceptation des échantillons	11
6.2 Conservation des échantillons avant analyse	11
6.3 Conservation des échantillons ou reliquats après analyse	11
7. Mode opératoire	11
7.1 Préparation des échantillons pour analyse	11
7.2 Extraction d'ADN	12
7.3 Contrôles et témoins.....	12
7.4 Amplification d'ADN	13
7.4.1 Test PCR spécifique	13
7.4.2 PCR universelle	14
7.4.3 Électrophorèse.....	15
7.5 Résultats	16
8. Interprétation et formulation du résultat de l'analyse biomoléculaire	18
9. Caractéristiques de performance de la méthode	19
Bibliographie	20

Introduction

Les « faux nématodes à galles » du genre *Nacobbus* (Fig. A) sont des nématodes phytoparasites polyphages. Le genre *Nacobbus* inclut plusieurs espèces, parmi lesquelles, le groupe *Nacobbus aberrans* considéré comme un complexe d'espèces (Lax, 2021) : le test décrit dans ce protocole vise à identifier *Nacobbus aberrans sensu lato*.

En 2024, *N. aberrans* est présent uniquement aux Etats Unis et en Amérique latine (EPPO, 2023). Des introductions aux Pays-Bas (de Bruijn, 1968) et au Royaume Uni (Franklin, 1959) ont été signalées sous serre mais son implantation n'a jamais été constatée en Europe.

La gamme d'hôte de *N. aberrans* représente plus de 84 espèces de plantes cultivées ou adventices appartenant à 18 familles botaniques (Manzanilla-López et al., 2002). Cet endoparasite des racines peut être trouvé sur de nombreuses plantes d'importance, telles que la pomme de terre, la tomate, la betterave, le haricot, la carotte ou encore le chou. Ces nématodes ont la particularité de former des galles (Fig B et C) sur les racines et tubercules des végétaux et ainsi causer d'importantes altérations du système racinaire. Les conséquences sont une diminution de la croissance végétale, des jaunissements, des flétrissements entraînant une baisse de rendement.

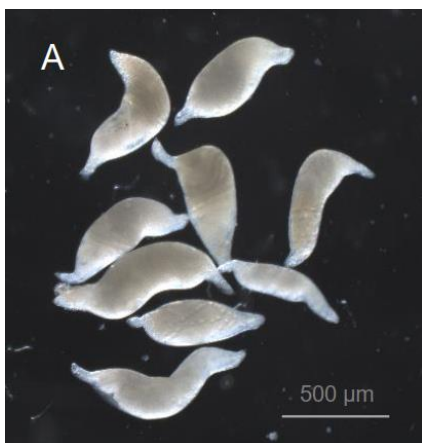


Fig.A : Observation de femelles matures de *Nacobbus* sp. à la loupe inoculaire. (© Anses)

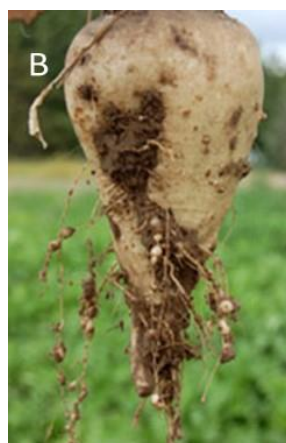


Fig. B. Betterave sucrière mature présentant des galles sur les radicelles latérales de la racine, caractéristiques du faux nématode à galles (*N. aberrans*). (© R. M. Harveson)



Fig. C. Galles présentes sur radicelles d'une racine pivot de betterave sucrière infectée par *N. aberrans*. (© R. M. Harveson)

Avertissements et précautions de sécurité

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

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

Le laboratoire doit mettre en place une procédure adaptée à son environnement (locaux, infrastructures, équipements, etc.) visant à éviter tout risque de contamination d'un échantillon par un autre et de dissémination dans l'environnement.

La détention et/ou la manipulation du nématode *Nacobbus aberrans* est soumise à l'obtention d'un agrément.

Objet et domaine d'application

Cette méthode a été développée pour identifier les nématodes de l'espèce *Nacobbus aberrans sensu lato* par analyses biomoléculaires.

Cette méthode est notamment appliquée, après la mise en œuvre de la méthode ANSES/LSV/MA072 en cas de détection de nématode(s) du genre *Nacobbus* ou de suspicion de présence de nématodes du genre *Nacobbus*.

Les échantillons analysés sont des nématodes isolés en laboratoire à partir d'extraits issus d'échantillons d'organes végétaux non ligneux. Les nématodes isolés peuvent être des larves infectieuses (stade L2), des femelles, des mâles ou des formes renflées de *Nacobbus sp.*

1. Documents de référence

- [1] MOA 022 : techniques qualitatives d'amplification enzymatique des acides nucléiques : PCR (Polymerase Chain Reaction), RT-PCR (Reverse Transcription-PCR) et PCR temps réel. Détection et identification des organismes phytopathogènes.
- [2] Rapport : Evaluation d'une méthode d'identification de *Nacobbus aberrans* sur individus isolés par PCR temps réel. (2024)

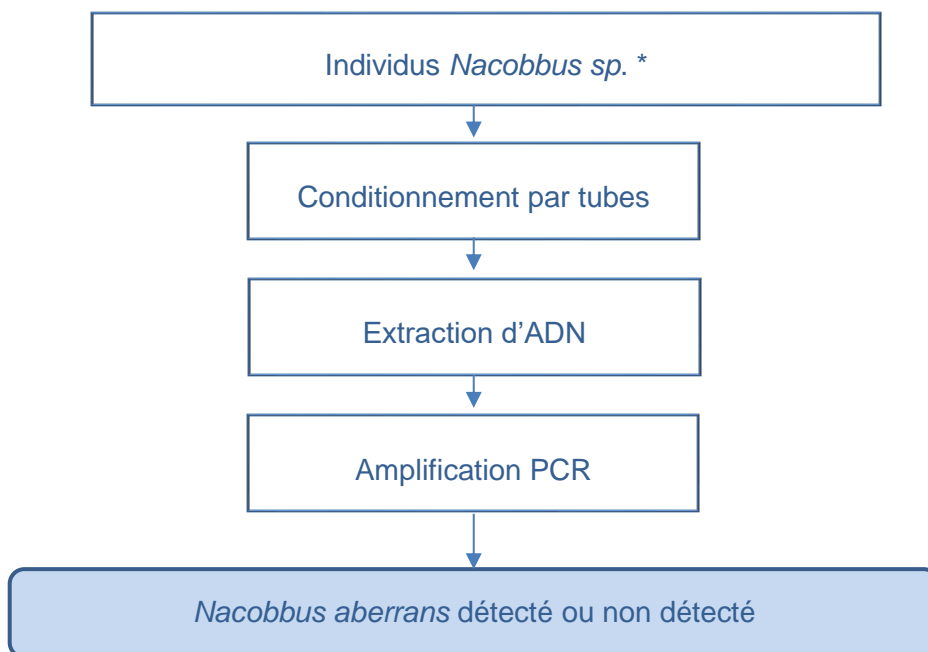
2. Termes, sigles et définitions

Afin d'éviter toute mauvaise interprétation des termes employés, le vocabulaire utilisé dans la présente méthode d'analyse est issu des normes, guides ou glossaires nationaux ou internationaux appropriés (AFNOR, ISO, CIPV, OEPP...).

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

3. Principe de la méthode

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



* ou toute suspicion de *Nacobbus sp.* si les analyses morphologiques ne permettent pas de statuer sur le genre avec certitude

4. Réactifs et consommables

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 dits de qualité de biologie moléculaire, nettoyage, stérilisation ou tout autre traitement approprié) à l'absence dans l'eau, produits et consommables utilisés, de contamination (ADN ou ARN), de nucléase, d'inhibiteur ou de tout autre élément pouvant interférer avec 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.

4.1 Tampon d'extraction

Le tampon d'extraction utilisé est issu de la publication Ibrahim *et al.*, 1994.

Sa composition : Tris HCl 10mM pH=8,0 ;
 EDTA 1mM ;
 Nonidet P40 1% ;
 Protéinase K : 100µg/mL de tampon final.

Tout autre kit ou protocole d'extraction d'ADN peut être utilisé dès lors qu'il donne des résultats au moins équivalents à ceux obtenus avec le tampon d'extraction préconisé.

4.2 Mastermix et oligonucléotides

Les consommables validés, le mastermix SYBR® Green et la Taq polymérase utilisés pour la validation des tests PCR sont les suivants :

- Pour la PCR temps réel : le pré-mix LightCycler® 480 SYBR green Master (réf : 04707516001 ou 04887352001) de la société Roche Diagnostics.
- Pour la PCR conventionnelle : la Taq MP Biomedical (ref. EPTQD925).

D'autres mélanges réactionnels prêts à l'emploi ou d'autres Taq polymérase peuvent être utilisés sous réserve de démontrer préalablement qu'ils permettent d'obtenir, pour cette méthode, des niveaux de performances au moins équivalents à ceux qui sont cités au § [9. Caractéristiques de performance de la méthode](#) en terme de sensibilité et de seuil de détection. Il peut être nécessaire d'adapter les conditions d'amplification en fonction des préconisations fournisseurs pour les étapes de dénaturation et d'élongation.

Les primers utilisés sont décrits dans le tableau 1 ci-dessous :

Tableau 1 : Séquences des amorces

Cible	Référence bibliographique	Amorces	Séquences 5'→3'	Taille du fragment amplifié
<i>Nacobbus aberrans</i>	Anthoine & Mugniéry (2005)	Nab F ⁽¹⁾ Nab-R ⁽¹⁾	ACG TCT AAG GAT GGC AGC AG AGG AGT TGA GCG GAA AAC C	295 pb
Tous nématodes	Zijlstra <i>et al.</i> (1995) ⁽²⁾	18S 26S	TTG ATT ACG TCC CTG CCC TTT TTT CAC TCG CCG TTA CTA AGG	~ 900/950 pb pour <i>Nacobbus sp.</i> ~760 pb pour <i>Meloidogyne sp.</i>

⁽¹⁾ correspond aux primers 18Sint-F et R de la publication, ils ont été renommés pour des raisons de praticité.

⁽²⁾ peut être remplacé par tout autre test PCR permettant d'amplifier l'ADN de nématodes.

4.3 Consommables divers

- ✓ Piston Pellet pour tube 1,5 mL
- ✓ Billes de 3 mm et de 1 mm
- ✓ Eau ultra pure de qualité biologie moléculaire
- ✓ Tampon de charge
- ✓ Marqueur de taille moléculaire
- ✓ Agarose qualité biologie moléculaire
- ✓ Tampon d'électrophorèse : Tris Acétate EDTA (TAE) ou Tris Borate EDTA (TBE)

5. Appareillage et matériels

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

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

Tableau 2 : Grandeurs et EMT associées selon MOA022

Grandeur	EMT ou valeur seuil
Volume	Volume < 10 mL : EMT = $\pm 10\%$ ou se référer à la norme ISO 8655 (version en vigueur).
Température	réfrigérateur : 5°C et EMT = $\pm 4^\circ\text{C}$ (ou plus strict en fonction des recommandations fournisseur) congélateur : $\leq -10^\circ\text{C}$ ou $\leq -18^\circ\text{C}$ en fonction des recommandations fournisseur thermocycleur* : EMT justesse = $\pm 1^\circ\text{C}$; EMT homogénéité = $\pm 2^\circ\text{C}$

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

En plus de l'appareillage courant d'un laboratoire de biologie moléculaire (pipettes, bain-marie, cuves d'électrophorèse, système de prise de vue de gel d'électrophorèse, etc.), le matériel suivant est jugé nécessaire pour certaines phases de l'analyse :

- Broyeur de tissu oscillant pour microtubes d'environ 2 mL (par exemple Tissulyser, Qiagen®) ou matériel équivalent,
- Appareil de PCR conventionnelle et appareil de PCR temps réel.

6. Échantillons

6.1 Conditions d'acceptation des échantillons

Les échantillons sont issus des analyses de détection ayant pour cible les nématodes des genres *Meloidogyne* et *Nacobbus*. Les échantillons sont constitués d'individus détectés comme appartenant au genre *Nacobbus*.

6.2 Conservation des échantillons avant analyse

Les reliquats d'échantillons sont stockés au froid positif.

Les individus conditionnés en microtubes sont stockés au congélateur en attente de l'analyse.

6.3 Conservation des échantillons ou reliquats après analyse

Les reliquats d'échantillons sont stockés au froid positif *a minima* jusqu'à la fin de l'analyse.

7. Mode opératoire

7.1 Préparation des échantillons pour analyse

Les individus préalablement isolés sont conditionnés en microtubes contenant environ 100µL de tampon d'extraction pour l'identification biomoléculaire.

On conditionne par tube au maximum : 5 L2 ou 3 mâles ou 3 femelles immatures ou 1 femelle blanche². Si le nombre d'individus est suffisant dans l'échantillon, préparer 3 microtubes par type de stade présent.

² Les femelles translucides ou partiellement translucides sont vides (ou partiellement) et ne contiennent plus ou peu d'ADN ; aucun résultat ne pourra être obtenu lors d'un test PCR.

La prise d'analyse est alors soit immédiatement soumise à extraction d'ADN, soit conservée en froid négatif jusqu'à l'extraction d'ADN. Si tous les stades sont présents dans l'échantillon, on réalise les analyses sur chacun d'eux. Un tube correspond à une prise d'essai.

7.2 Extraction d'ADN

L'extraction d'ADN résulte de l'action successive d'un broyage mécanique (billes de verre ou piston) et d'un traitement chimique (protéinase K).

Pour ce faire,

Cas des formes filiformes :

- Ajouter des billes de verre de diamètres différents (1 bille de 3 mm et environ 100 µL de billes de 1 mm de diamètre) dans le microtube contenant les nématodes.
- Placer sous agitation pendant environ 40 secondes à une fréquence d'environ 30 coups par seconde (microtubes préalablement décongelés).

Cas des formes renflées :

- Broyer les individus préalablement conditionnés en microtubes à l'aide d'un piston (ou mettre en œuvre tout autre moyen permettant de broyer les formes renflées).

Puis dans tous les cas :

- Placer les microtubes au bain-marie (entre 50 et 60°C) pendant au moins une heure, pour optimiser l'activité de la protéinase K.
- Si les ADN obtenus sont transférés en plaque pour la dénaturation de la protéinase K, centrifuger brièvement les microtubes pour précipiter les débris cellulaires et transférer le surnageant.
- Procéder à un nouveau traitement thermique des microtubes ou de la plaque après transfert des solutions d'ADN à environ 95°C pendant environ 10 min (dénaturation de la protéinase K).
- Si la dénaturation de la protéinase K a eu lieu dans les microtubes, centrifuger brièvement les microtubes pour précipiter les débris cellulaires avant de pipeter l'ADN.

7.3 Contrôles et témoins

Des échantillons de référence doivent être inclus en cours de processus analytique pour valider les différentes étapes de la méthode. Les contrôles à produire au cours de l'analyse sont au minimum les suivants :

- un témoin négatif de processus (E-) : un tube de tampon d'extraction identique à celui utilisé pour les échantillons et dans un volume identique, traité dans les mêmes conditions que les échantillons à analyser.

- les témoins positifs de PCR (A+) : il contient tous les éléments du mélange réactionnel, ainsi qu'un extrait d'ADN de ou des cibles recherchées; ces témoins permettent de vérifier que la réaction de PCR s'est déroulée de façon correcte et permet une amplification des échantillons contaminés.
- un témoin négatif de PCR (A-) : il contient tous les éléments du mélange réactionnel mais aucun extrait d'ADN n'est ajouté ; cela permet de vérifier l'absence de contamination au cours de la réaction de PCR.
- un témoin négatif de spécificité (facultatif) : il contient tous les éléments du mélange réactionnel, ainsi qu'un extrait d'ADN non cible ; cela permet de vérifier l'absence de réaction croisée au cours de la réaction de PCR. Ce type de témoin n'est pas nécessaire pour le test universel.

Selon les tests PCR, les extraits d'ADN à inclure seront issus des espèces suivantes (tableau 3):

Tableau 3 : Nature des témoins de PCR à inclure en fonction du test mis en œuvre

Témoin	PCR spécifique	PCR universelle
Témoin positif de PCR (A+)	<i>Nacobbus aberrans s.l.</i>	<i>Nacobbus aberrans s.l.</i> (ou <i>Nacobbus sp.</i> ou <i>Meloidogyne sp.</i>)
Témoin négatif de spécificité	<i>Nacobbus sp.</i> (autre que <i>N. aberrans</i>) ou <i>Meloidogyne sp.</i>	

Ces témoins permettent de vérifier le bon fonctionnement des étapes d'extraction d'ADN et de PCR (extraction et amplification de l'ADN de la cible pour les contrôles positifs, l'absence de contamination pour les contrôles négatifs).

7.4 Amplification d'ADN

Chaque extrait d'ADN est testé en duplicat.

7.4.1 Test PCR spécifique

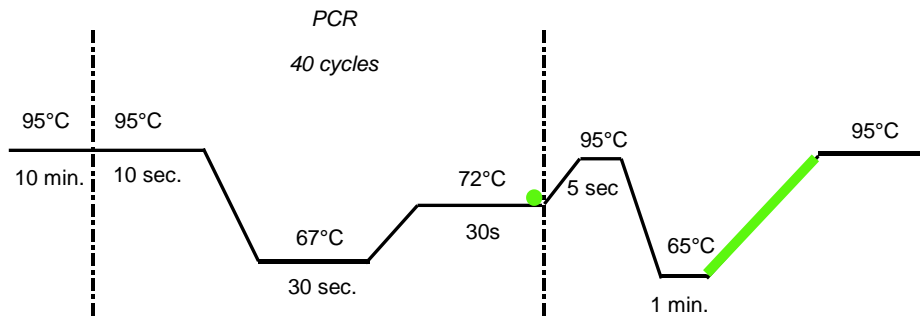
- Test *Nacobbus* – primers **Nab F/ Nab R** (Anthoine & Mugniéry, 2005)

L'amplification d'ADN est réalisée dans les conditions suivantes :

Réactifs	Test Nab F/ Nab R (2005) Concentration finale par tube de réaction
Volume réactionnel total	20 µL
Pré-mix commercial	1 X
Amorces Nab F :	0,25 µM
Nab R :	0,25 µM
Eau ultra pure	qsp 17 µL
Extrait ADN	3 µL

Appliquer le programme d'amplification suivant :

13/20



● acquisition
fluorescence

de la

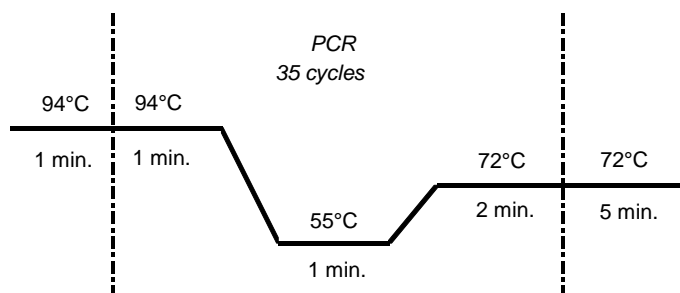
7.4.2 PCR universelle

Ce test est réalisé lorsque le test spécifique ne génère aucune amplification ou ne génère pas d'amplification correspondant à la cible recherchée (voir logigramme décisionnel présenté dans le point 8.4).

L'amplification d'ADN est réalisée dans les conditions suivantes :

	Test 18S-26S (Zijlstra <i>et al.</i>, 1995)
Réactifs	Concentration finale par tube de réaction
Volume réactionnel total	30 µL
Tampon Taq DNA polymérase	1 X
MgCl ₂ (prendre en compte le MgCl ₂ éventuellement présent dans le tampon Taq)	1,5 mM
Amorces 18S 26S	0.6 µM 0.6 µM
dNTPs	0.1 mM
Taq DNA polymérase	0,6 unité
Eau ultra pure	Qsp 25 µL
Extrait ADN	5 µL

Appliquer le programme d'amplification suivant :



Dans le cas des tests par PCR conventionnelle (test universel), réaliser les opérations décrites dans le paragraphe 7.4.3.

7.4.3 Électrophorèse

Préparer un gel d'agarose entre 1,5 et 2% environ dans un tampon TAE ou TBE (voir MOA-REP 001). Le marqueur d'ADN (intercalant) peut soit être ajouté dans le gel lors de sa préparation, soit ultérieurement dans le bain de révélation.

Une échelle de poids moléculaire, dont l'intervalle encadre la taille des fragments attendus, doit être déposée sur chaque ligne de dépôts afin de définir la taille du fragment obtenu.

Faire migrer les produits d'amplification en appliquant un courant électrique.

Révélation :

La révélation est réalisée après immersion dans une solution de marqueur d'ADN (par exemple, le bromure d'éthidium, BET, est souvent utilisé comme marqueur à la concentration de 1 µg/mL). Si le marqueur d'ADN était présent dans le gel au départ, passer directement à l'étape suivante.

Observer le gel sous UV.

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

Conservation des résultats :

L'observation de gel sous U.V. ne constitue pas un moyen suffisant pour garantir la traçabilité des résultats. Un équipement adapté fournissant une copie /image fidèle du gel sur un support stable dans le temps et référencé est nécessaire.

7.5 Résultats

Pour tous les tests PCR, l'analyse est validée si les conditions ci-dessous sont vérifiées :

Tableau n°4 : Conditions de validation des analyses, analyse des témoins :

Type de contrôle	Résultat attendu et devant être observé
Contrôle négatif de processus	NÉGATIF
Contrôle négatif de PCR	NÉGATIF
Contrôle(s) positif(s) de PCR	POSITIF(S)
Contrôle négatif de spécificité (sauf PCR universelle)	NÉGATIF

L'interprétation s'entend par prise d'essai.

Pour la PCR temps réel :

Les résultats obtenus par PCR temps réel sont traités par une analyse automatique du logiciel du thermocycleur. Une analyse de type quantitative permet de déterminer le *crossing-point* (ou *Cp*) des produits amplifiés.

Pour qu'une prise d'essai soit considérée comme positive, son *Cp* doit être inférieur à une valeur de cut off définie à 35 dans les conditions d'analyse du LNR, la courbe d'amplification doit être de type exponentiel. Le test étant spécifique, il n'est pas nécessaire de prendre en compte le *Tm*. Dans le cadre d'une identification de *Nacobbus aberrans sensu lato*, le *Tm* ne sera pas interprété car il peut varier au sein du groupe d'espèce.

Pour la PCR conventionnelle :

L'analyse est qualitative. Le résultat d'un puits est :

- négatif lorsqu'aucune amplification n'est observée,
- négatif lorsqu'aucune amplification à la taille attendue n'est observée,
- positif lorsqu'un fragment de taille attendue est observé.

Les tailles de fragments attendues pour la PCR conventionnelle et l'interprétation des PCR temps réel sont résumées dans le tableau n°5:

Tableau n°5 : Résultats attendus par test PCR et par cible si présente :

Cible \ PCR	Test spécifique <i>N. aberrans</i>	PCR universelle
<i>Nacobbus aberrans</i>	Cp<35	Environ 900/950pb pour <i>Nacobbus sp.</i>
<i>Nacobbus sp (autre que N. aberrans)</i> ou <i>Melo sp.</i>	/	Environ 760pb pour <i>Meloidogyne sp.</i>

Le résultat d'un test PCR est obtenu en suivant les indications mentionnées dans les tableaux suivants :

Pour la PCR spécifique :

Analyse		Résultat du test
Puits 1	Puits 2	
+	+	POSITIF
+	-	PCR à refaire. Si au moins 1 positif sur 2 lors de la 2 ^{ème} amplification, le résultat est interprété comme positif.
-	-	NÉGATIF, test PCR universelle à réaliser ou tout autre test générant une amplification

Remarque : + : observation d'une courbe d'amplification exponentielle avec une valeur de $C_p < 35$,
 - : absence de courbe d'amplification exponentielle avec une valeur de $C_p < 35$.

Pour la PCR universelle 18S-26S :

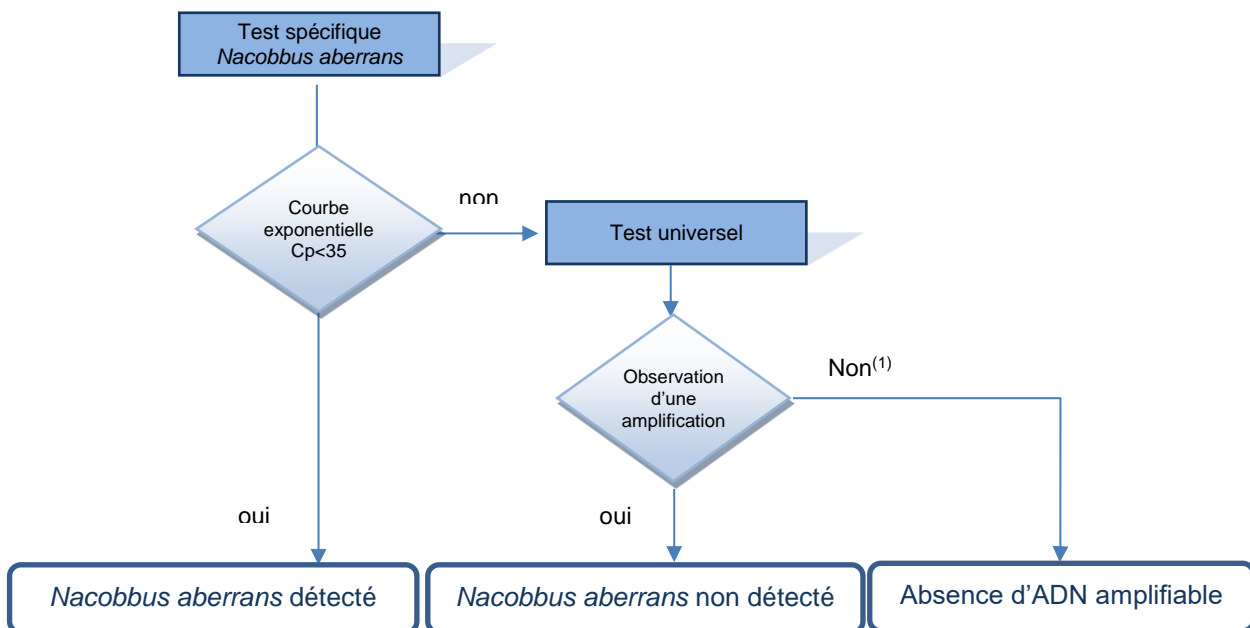
Analyse		Résultat du test
Puits 1	Puits 2	
+	+	POSITIF
+	-	POSITIF
-	-	NÉGATIF

Remarque : + et - correspondent respectivement à la présence et à l'absence du fragment d'amplification à la taille attendue selon le genre de nématode utilisé comme témoin.

8. Interprétation et formulation du résultat de l'analyse biomoléculaire

Le résultat de l'analyse biomoléculaire est une synthèse des résultats obtenus par prises d'essai analysés.

L'interprétation des résultats de l'analyse biomoléculaire est réalisée en suivant le logigramme ci-après :



Si aucune amplification n'est obtenue et si cela est possible, de nouveaux individus sont analysés. En cas d'absence de résultats en biologie moléculaire lors de la deuxième analyse ou absence de reliquats, le client en est informé et un rapport d'analyse est édité avec pour résultat :

- « *Nacobbus* sp. détecté » sur la base de l'analyse morphologique si l'analyse a été réalisée sur le stade femelle (immature et/ou mature) selon la méthode de détection (ANSES/LSV/MA072). Une mention pourra être apportée en commentaire pour indiquer l'impossibilité de statuer sur l'espèce.
- « ADN non amplifiable », pour les autres stades, ou en cas d'individus trop dégradés pour permettre l'observation correcte des critères morphologiques pertinents, l'analyse morphologique ne permettant pas de statuer avec certitude sur le genre. Il pourra alors être précisé dans la section « commentaire » du rapport la (les) raison(s) de ce résultat et la nécessité, si possible, pour le client de procéder à de nouveaux prélèvements pour approfondir l'analyse.

Le résultat porté sur le rapport d'analyse sera selon le cas :

Nacobbus aberrans « détecté » ou « non détecté », « *Nacobbus* sp. détecté » ou « ADN non amplifiable ».

9. Caractéristiques de performance de la méthode

La synthèse des caractéristiques de performance de la méthode présentée ci-après est extraite du rapport de validation établi par le LNR : « Evaluation d'une méthode d'identification de *Nacobbus aberrans* sur individus isolés par PCR temps Réel », 2024.

Synthèse des résultats de l'évaluation de l'outil d'identification de *Nacobbus aberrans* par PCR temps réel.

Test adapté de Anthoine et Mugniéry. (2005)

	Nab F/Nab R
Sensibilité – inclusivité*	100%
Spécificité - exclusivité*	100%
Exactitude	100%
Seuil de détection	1J2
	<i>à 1J2</i>
Répétabilité	100%
Reproductibilité	100%
Facilité de mise en œuvre	+
Facilité d'interprétation des résultats	+

*la sensibilité-inclusivité a été évaluée sur 4 populations de *Nacobbus aberrans* de 3 origines géographiques différentes (Argentine, Bolivie et Pérou (x2)). La spécificité-exclusivité a été évaluée sur 36 espèces différentes dont 4 espèces du genre *Globodera*, 4 espèces du genre *Heterodera*, 11 espèces du genre *Meloidogyne*, une espèce du genre *Pratylenchus* et une espèce du genre *Punctodera*.

Bibliographie

- Anthoine G., Mugniéry D. (2005) « Variability of the ITS rDNA and identification of *Nacobbus aberrans* (Thorne, 1935) Thorne & Allen, 1944 (Nematoda: Pratylenchidae) by rDNA amplification », *Nematology* 7(4), 503-516,
- de Bruijn, N., Stemerding (1968) S. *Nacobbus serendipiticus*, a plant parasitic nematode new to The Netherlands. *Netherlands Journal of Plant Pathology* 74, 227–228. <https://doi.org/10.1007/BF01974246>
- EPPO/OEPP (2009) PM7/5 (2) Diagnostic protocols for regulated pests :*Nacobbus aberrans sensu lato*. Bulletin OEPP/EPPO (2009) 39, 346-381
- Franklin M.T. (1959) *Nacobbus serendipiticus* n. sp., a root-galling nematode from tomatoes in England. *Nematologica* 4, 286–293.
- Ibrahim S.K., Perry R.N., Burrows P.R.. & Hooper DJ. (1994) Differentiation of species and populations of *Aphelenchoides* and of *Ditylenchus angustus* using a fragment of ribosomal DNA. *Journal of Nematology* 26, 412 421.
- Lax P., Gonzalez-Iltig R.E., Rondan Dueñas J.C., et al. (2021) Decrypting species in the *Nacobbus aberrans* (Nematoda: Pratylenchidae) complex using integrative taxonomy. *Zoologica Scripta*. 50: 667–688. <https://doi.org/10.1111/zsc.12494>
- Manzanilla-Lopez R.H., Costilla M.A., Doucet M., Franco J., Inserra R.N., Lehman P.S., Cid del Prado V., Souza R.M., Evans K. (2002) The genus *Nacobbus* Thorne & Allen, 1944 (Nematoda: Pratylenchidae): systematics, distribution, biology and management. *Nematropica* 32, 149–227