



## TEST PCR

(Polymerase Chain Reaction ou Réaction en chaîne par polymérase)

Lise Vézina, technicienne de laboratoire spécialiste  
Direction de la phytoprotection

Au Laboratoire de diagnostic en phytoprotection, le test PCR est utilisé pour la détection de plusieurs bactéries comme *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*, *Erwinia tracheiphila*, *Rhizobium radiobacter* (*Agrobacterium tumefaciens*), les *Streptomyces* phytopathogènes, *Xanthomonas hortorum* pv. *pelargonii* (*Xanthomonas campestris* pv. *pelargonii*), *Xanthomonas fragariae*, pour le champignon *Plasmodiophora brassicae* et pour les phytoplasmes.

Dans la majorité des cas, ces micro-organismes phytopathogènes sont difficilement ou non isolables sur milieux de culture gélosés et le test PCR nous permet de contourner cette étape. En plus, cette technique est celle offrant le plus haut niveau de spécificité et de sensibilité.



Chancre bactérien (*Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*) sur la tomate



Gale commune (*Streptomyces* spp.) sur la pomme de terre



Tumeur de la tige (*Rhizobium radiobacter*) sur le framboisier



Hernie des crucifères (*Plasmodiophora brassicae*) sur le chou



Phyllodie ou pétales verts (Phytoplasme) sur le fraisier



bande ne sera visible lors de la visualisation des résultats.

- ❖ Un témoin positif d'amplification constitué d'un extrait ADN du micro organisme recherché déjà identifié par PCR afin de vérifier si l'étape d'amplification a bien fonctionné. Une bande correspondant à la dimension du segment d'ADN de notre micro organisme recherché sera présente lors de la visualisation des résultats.
- ❖ Un témoin positif d'extraction constitué du micro organisme recherché afin de vérifier si l'étape d'extraction a bien été effectuée. Une bande correspondant à la dimension du segment d'ADN de notre micro organisme recherché sera présente lors de la visualisation des résultats

Plusieurs précautions sont nécessaires afin d'éviter toute contamination : mettre des gants et les changer entre chacune des étapes, préparer les dilutions des extractions dans une hotte stérile à flux laminaire, ne jamais utiliser les mêmes pipettes pour la préparation du mélange de réactifs et pour la dilution et l'addition des extractions d'ADN, utiliser une hotte spécifique à la technique PCR pour la préparation du mélange, cette hotte sera nettoyée avec un produit éliminant toute trace d'ADN; aucun tube contenant de l'ADN ou des amplicons ne doit être ouvert dans cette hotte.

Pour la recherche de *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*, d'*Erwinia tracheiphila* et de *Plasmiodiophora brassicae*, le système vasculaire ou les tumeurs sont prélevés et déposés dans un sac pour broyage. Cette étape peut se faire à l'aide d'un adaptateur à billes où le système vasculaire ou les galls sont broyés jusqu'à liquéfaction dans de la saline stérile. Le broyat d'un plant déjà diagnostiqué positif par PCR nous servira de témoin positif d'extraction.



Une partie du broyat est placée dans un micro tube et le réactif DNAzol (réactif enregistré par Molecular Research Center Inc.), servant à briser

les parois et les membranes cellulaires, est ajouté. Après centrifugation, le surnageant est transféré dans un nouveau micro tube et de l'éthanol à 100% y est ajouté. Un temps de repos à température de la pièce permet la précipitation de l'ADN suivi d'une centrifugation. Le culot d'ADN ainsi formé est lavé deux fois avec de l'alcool 95% afin de séparer l'ADN des protéines. Il est par la suite séché à l'aide d'un dessiccateur rotatif (Speed vac) et le culot est solubilisé dans du NaOH (8mM) et de l'HEPES (1M).

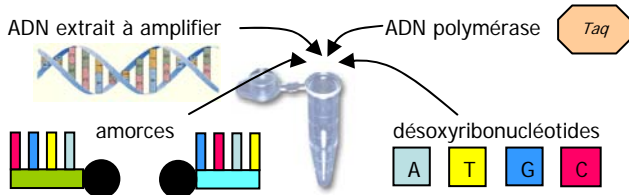


Pour la recherche de *Rhizobium radiobacter* (*Agrobacterium tumefaciens*), de *Xanthomonas hortorum* pv. *pelargonii* (*Xanthomonas campestris* pv. *pelargonii*) et de *Xanthomonas fragariae* les tumeurs, les tiges ou les feuilles symptomatiques sont coupées en petits morceaux et placées dans un tube contenant du tampon d'extraction composé de tris, de NaCl, de EDTA, de SDS et de PVP. Après agitation, une partie du tampon est transférée dans un micro tube et centrifugée. Le surnageant est transféré dans un nouveau micro tube et incubé à 93°C afin de dénaturer les cellules. Après une centrifugation, le surnageant est transféré dans un nouveau micro tube et de l'isopropanol froid est ajouté. Une incubation à -20°C sert à précipiter l'ADN suivi d'une centrifugation. Le culot d'ADN ainsi formé est lavé deux fois avec de l'alcool 95% afin de séparer l'ADN des protéines. Il est par la suite séché à l'aide d'un dessiccateur rotatif (Speed vac) et le culot est solubilisé dans H<sub>2</sub>O HPLC stérile.

## AMPLIFICATION DES FRAGMENTS CIBLES D'ADN

Cette étape sert à multiplier la séquence cible de l'ADN spécifique au micro organisme recherché. Comme il est mentionné précédemment, à partir d'un échantillon complexe et peu abondant, nous pouvons obtenir rapidement des millions de copies d'un segment précis d'ADN en quelques heures. La technique consiste à répéter des cycles de durée et de températures différentes. Il est important de diluer nos extraits d'ADN car une quantité trop importante d'ADN peut induire une fausse réaction négative.

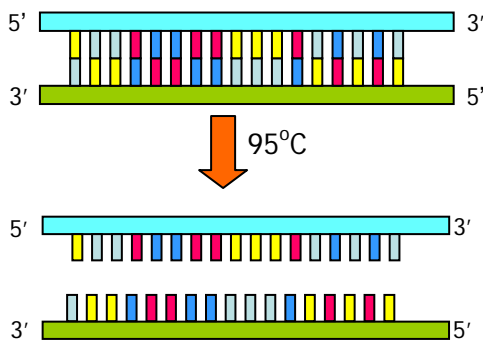
Les éléments essentiels à cette étape sont : l'ADN extrait, la paire d'amorces spécifiques au micro organisme recherché, l'ADN polymérase (*Taq* polymérase) et les quatre désoxyribonucléotides (dNTP's) soit l'adénine (A), la thymine (T), la cytosine (C) et la guanine (G). Tous sont ajoutés en large excès par rapport à l'ADN extrait.



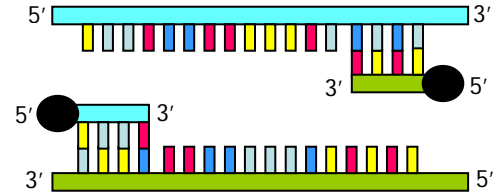
Un mélange de ces éléments dans un micro tube est placé dans un cycleur thermique (thermocycleur) et un programme est sélectionné selon le micro organisme recherché. Ce programme comprend le nombre de cycles nécessaire à l'obtention de millions de copies du gène (environ 30 cycles). Chacun des cycles comprend trois températures différentes soit une pour la dénaturation (environ 95°C), une pour l'hybridation (entre 40 et 65°C) et une pour l'élongation (à 72°C).



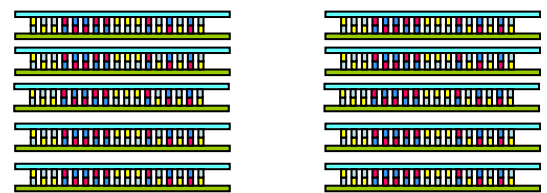
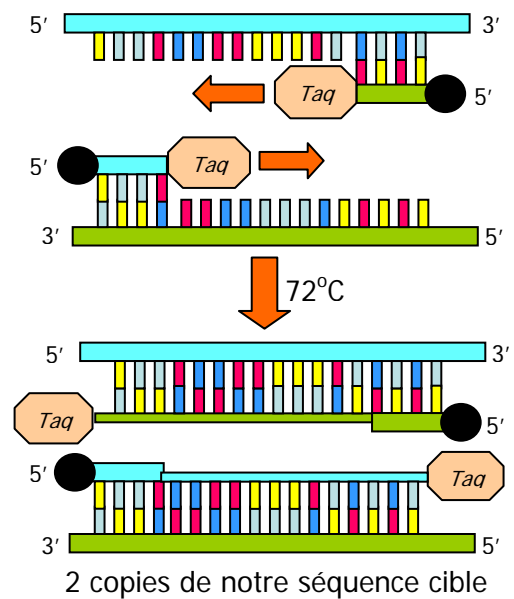
La dénaturation de l'ADN se fait à haute température; à 95°C, les liaisons hydrogène qui maintiennent ensemble la double hélice d'ADN sont rompues et deux brins simples sont obtenus.



La température est abaissée pour l'hybridation des amorces; celles-ci se fixent sur le brin d'ADN, il y a alors appariement avec les bases complémentaires.



Finalement, la température remonte pour effectuer l'élongation; durant cette étape, la *Taq* polymérase se fixe aux amorces, servant de point de départ, et ajoute des désoxyribonucléotides (dNTP's) afin de synthétiser le brin complémentaire de l'ADN. La répétition de ce cycle de températures permet l'obtention de plusieurs copies du fragment d'ADN cible.

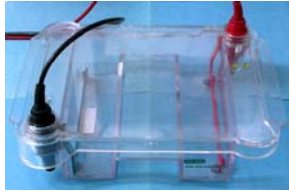


Le cycle est répété plusieurs fois (environ 30 cycles) afin d'obtenir plusieurs copies de notre séquence d'ADN cible.

## VISUALISATION DE L'ADN ET INTERPRÉTATION DES RÉSULTATS

La visualisation du fragment d'ADN d'un micro organisme recherché se fait lors de l'électrophorèse sur gel d'agarose suivi d'une coloration au bromure d'éthidium. Cette étape du test PCR est basée sur l'attraction des acides

nucléiques (ADN) chargés négativement sous l'effet d'un champ électrique. La séparation s'effectue lors du passage de l'amplicon (produits de l'amplification) à travers un gel d'agarose. Les fragments d'ADN de petites tailles se déplacent plus rapidement que ceux de grandes tailles et migrent plus loin. Plus les fragments sont longs, plus la migration est lente ainsi la durée de la migration et le voltage employé varieront selon la dimension du fragment d'ADN amplifié.

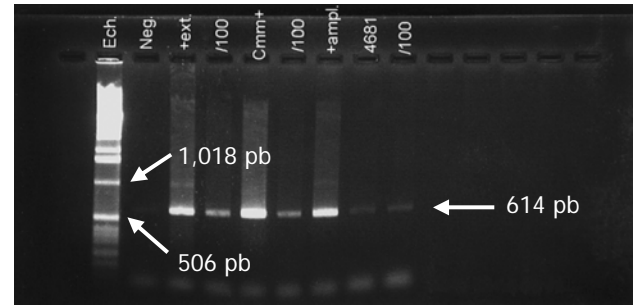


Le gel d'agarose est placé dans un appareil à électrophorèse et est recouvert d'un tampon d'électrophorèse composé de tris, d'acide acétique glacial et de EDTA. Une échelle de marqueurs de poids moléculaires nucléotidiques (1 Kb) est déposée dans le premier puits; elle servira à mesurer le poids moléculaire du segment d'ADN multiplié. Une petite quantité de l'amplicon mélangé à une solution de Bleu Endo-R-Stop 10X est déposée dans un puits. La migration se fait du pôle négatif au pôle positif et est arrêtée lorsque le mélange atteint la fin du gel soit à 1 cm de la base du gel.

Une coloration au bromure d'éthidium permet de révéler des bandes présentes sur le gel d'agarose. Le bromure d'éthidium est un marqueur d'acides nucléiques. Le gel est submergé dans une solution de bromure d'éthidium (2 µg/ml), à la noirceur, avec une légère agitation de 20 minutes et il est rincé à l'eau déminéralisée durant 20 minutes toujours à la noirceur et avec une légère agitation. La coloration au bromure d'éthidium est révélée sous une lumière ultra violette (UV); le gel est photographié à l'aide d'un appareil photo numérique. La distance parcourue par le fragment d'ADN amplifié ainsi que des témoins positifs d'extraction et d'amplification est comparée à l'échelle de poids moléculaires.

Basé sur des références, la dimension du fragment d'ADN (nombre de paires de bases) spécifique au micro organisme recherché est connue. Il suffit de comparer la hauteur de la bande apparaissant sur le gel d'agarose coloré avec l'échelle de poids moléculaires. Si la bande est à la bonne hauteur, nous sommes alors en

présence du micro organisme recherché. Il est important de vérifier la hauteur de la bande de nos témoins positifs d'extraction et d'amplification; elles devraient être la même que celle de l'ADN extrait du micro organisme recherché.



## RÉFÉRENCES

- Dong, L.C., C.W. Sun, K.L Thies, D.S. Luthe et C.H. Graves Jr. 1992. Use of polymerase chain reaction to detect pathogenic strains of *Agrobacterium*. *Phytopathology* 82: 434-439.
- Picard C., C. Ponsonnet, E. Paget, X. Nesme et P. Simonet. 1992. Detection and enumeration of bacteria in soil by direct DNA extraction and polymerase chain reaction. *Appl. Environ. Microbiol.* 58: 2717-2722.
- Cubero, J., M.C. Martinez, P. Llop et M.M. Lopez. 1999. A simple and efficient PCR method for the detection of *Agrobacterium tumefaciens* in plant tumours. *Journal of Applied Microbiology* 86 : 591-602.
- Sawada H., H. Ieki et I. Matsuda. 1995. PCR detection of Ti and Ri plasmids from phytopathogenic *Agrobacterium* strains. *Applied Environmental Microbiology* 61 : 828-831.
- De Boer S.H., L.J. Ward, X. Li et S. Chittaranjan. 1995. Attenuation of PCR inhibition in the presence of plant compounds by addition of BLOTTO. *Nucleic Acids Research* 23 : 2567-2568.
- Kawaguchi A., Sawada H. et Inoue K. 2005. Multiplex PCR for the identification of *Agrobacterium* biovar 3 strains. *Journal of general plant pathology* 71: 54-59.

Suzaki K., Yoshida K. et Sawada H. 2004. Detection of tumorigenic *Agrobacterium* strains from infected apple saplings by colony PCR with improved PCR primers. *Journal of general plant pathology* 70: 342-347.

Nesme X., M.-C. Leclerc et R. Bardin. 1989. PCR detection of an original endosymbiont: the Ti plasmid of *Agrobacterium tumefaciens*. *Endocytobiology IV*: 47-50.

Dreier, J., A. Bempohl et R. Eichenlaub. 1995. Southern hybridization and PCR for specific detection of phytopathogenic *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*. *Phytopathology* 85: 462-468.

Sulzinski M.A., G.W. Moorman, B. Schlaghauser et C.P. Romaine. 1997. A simple DNA extraction method for PCR-based detection of *Xanthomonas campestris* pv. *pelargonii* in geraniums. *J. Phytopathology* 145 : 213-215.

Sulzinski M.A., G.W. Moorman, B. Schlaghauser et C.P. Romaine. 1996. Characteristics of a PCR-based assay for in planta detection of *Xanthomonas campestris* pv. *pelargonii*. *J. Phytopathology* 144 : 393-398.

Sulzinski M.A., G.W. Moorman, B. Schlaghauser et C.P. Romaine. 1995. Fingerprinting of *Xanthomonas campestris* pv. *pelargonii* and related pathovars using random-primed PCR. *J. Phytopathology* 143: 429-433.

Nameth S.T., M.L. Daughtrey, G.W. Moorman et M.A. Sulzinski. 1999. Bacterial blight of geranium : a history of diagnostic challenges. *Plant Disease* Vol 83 : 204-212.

Raghida A. Bukhalid, Soo Young Chung et R. Loria. 1998. Nec1, a gene conferring a necrogenic phenotype, is conserved in plant-pathogenic *Streptomyces* spp. and linked to a transposase pseudogene. *Molecular Plant-microbe interactions* vol.11 No 10 : 960-967.

Mahuku G.S. et Goodwin P.H. 1997. Presence of *Xanthomonas fragariae* in symptomless strawberry crowns in Ontario detected using a nested polymerase chain reactin (PCR). *Canadian journal of plant pathology* 19: 366-370.

Organisation européenne de la protection des plantes (EPPO). Data sheets on quarantaine pests, *Xanthomonas fragariae*.

Organisation européenne de la protection des plantes (EPPO). Diagnostic protocols for organisms harmful to plants. Diagnostic protocol for *Xanthomonas fragariae*. Kennedy et King.

Pooler M.R., Ritchie D.F. et Hartung J.S. 1996. Genetic relationships among strains of *Xanthomonas fragariae* based on random amplified polymorphic DNA PCR, repetitive extragenic palindromic PCR, and enterobacterial repetitive intergenic consensus PCR data and generation of multiplexed PCR primers useful for the identification of this phytopathogen. *Applied environmental microbiology* 62: 3121-3127.

Roberts P.D., Jones J.B., Chandler C.K., Stall R.E. et Berger R.D. 1996. Survival of *Xanthomonas fragariae* on strawberry in summer nurseries in florida detected by specific primers and nested polymerase chain reaction. *Plant disease* 80: 1283-1288.

Stöger A. et Ruppitsch W. 2004. A rapid and sensitive method for the detection of *Xanthomonas fragariae*, causal agent of angular leafspot disease in strawberry plants. *Journal of microbiological methods* 58: 281-284.

Bruton B., Melcher U., Zitter T., Pair S., Fletcher J. et Mitchell F. 1999. Polymerase chain reaction for detection of *Erwinia tracheiphila* in cucurbits. *Phytopathology* 89: S10.

Carraro L., F. Ferrini, P. Ermacora, N. Loi, M. Martini and R. Osler. 2004. *Macropsis mendax* as a vector of elm yellows phytoplasma of *Ulmus* species. *Plant Pathology* 53: 90-95.

Gundersen D.E. et I.-M. Lee. 1996. Ultrasensitive detection of phytoplasmas by nested-PCR assays using two universal primer pairs. *Phytopathologia Mediterranea* 35: 144-151.

Schneider B., E. Seemueller, C. D. Smart and B. C. Kirkpatrick. 1995. Phylogenetic classification of plant pathogenic mycoplasma-like organisms of phytoplasmas. Dans Razin, S. and Tully JG., eds.

Molecular and diagnostic procedures in mycoplasmaology. San Diego, CA, USA Academic Press, Vol 1, 369-380.

Caron, J. et L. Laverdière. Hortiprotection. Communication personnelle.

Ito, S. et al. 1997. Cloning of a simple-copy DNA sequence unique to *Plasmodiophora brassicae*. Physiological and Molecular Plant Pathology 50 : 289-300.

Ito, S. et al. 1999. Development of a PCR-based assay for the detection of *Plasmodiophora brassicae* in soil. J. Phytopathology 147 : 83-89.

La PCR. 2002.

<http://www.ens-lyon.fr/RELIE/PCR/index.html>

Wikipédia, l'encyclopédie libre.

[http://fr.wikipedia.org/wiki/R%C3%A9action\\_en\\_cha%C3%AEne\\_par\\_polym%C3%A9rase](http://fr.wikipedia.org/wiki/R%C3%A9action_en_cha%C3%AEne_par_polym%C3%A9rase)

Les photos de ce document ont été réalisées par Chantal Malenfant, technicienne de laboratoire au Laboratoire de diagnostic en phytoprotection, MAPAQ.

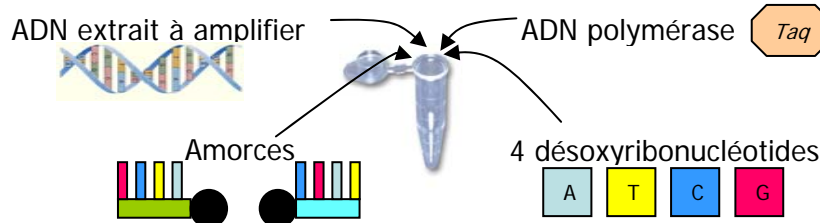
Ce document a été révisé par Gérard Gilbert, agronome-phytopathologiste et Marion Berrouard technicienne de laboratoire. Laboratoire de diagnostic en phytoprotection, MAPAQ Québec, décembre 2009.

Vous retrouverez ce document sur le site  
Agrireseau.qc.ca

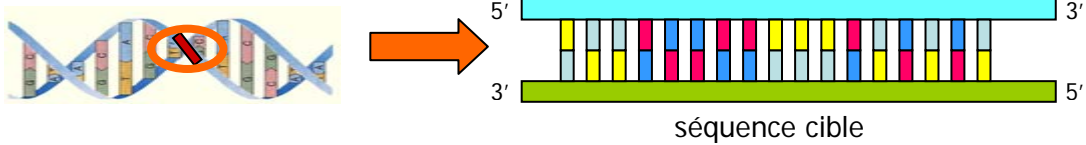


# SCHÉMA DE LA TECHNIQUE PCR

- **EXTRACTION DE L'ADN** du micro organisme recherché et du témoin d'extraction
- **AMPLIFICATION DE L'ADN**; ajouter tous les réactifs dans un micro tube

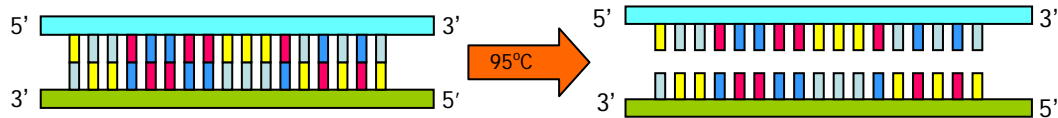


Séquence cible de l'ADN que l'on veut amplifier

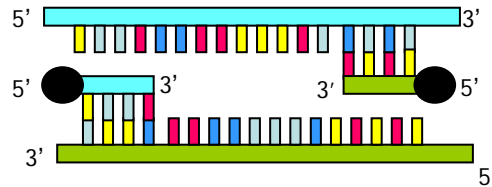


Le cycle PCR: la dénaturation, l'hybridation et l'élongation

## A- Dénaturation de l'ADN

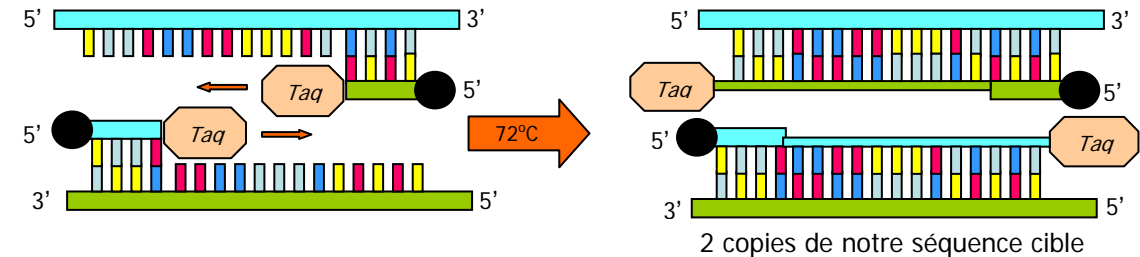


## B- Hybridation

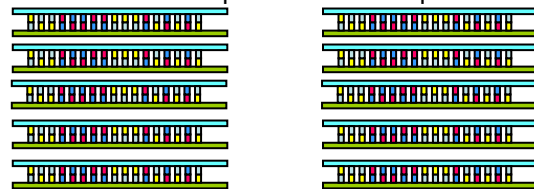


La température redescend entre 40 et 65°C;  
Les amorces se fixent à la séquence ciblée

## C- Élongation



Le cycle est répété plusieurs fois (environ 30 cycles) afin d'obtenir plusieurs copies de notre ADN cible.



## • VISUALISATION DE L'ADN ET INTERPRÉTATION DES RÉSULTATS

Électrophorèse sur gel d'agarose et visualisation par coloration de l'ADN cible.

Présence ou absence d'une bande du même poids moléculaire que notre ADN cible.

