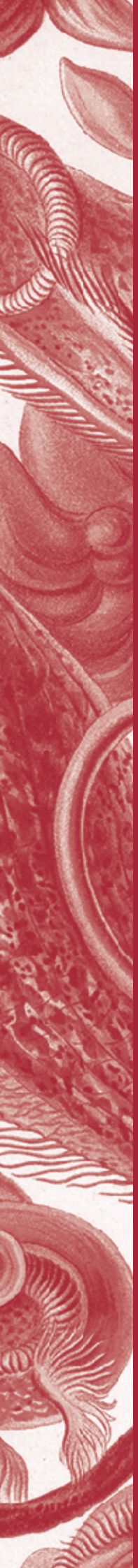

PROTOCOLES DE DIAGNOSTIC NORMES INTERNATIONALES POUR LES MESURES PHYTOSANITAIRES 27

Organisation des Nations Unies pour l'alimentation et l'agriculture

Convention internationale pour la protection des végétaux
Protéger les ressources végétales contre les organismes nuisibles

NIMP 27
ANNEXE 15

FRE

# PD 15:
# *Citrus tristeza virus*

Cette page est intentionnellement laissée vierge

Le présent protocole de diagnostic a été adopté par le Comité des normes au nom de la Commission des mesures phytosanitaires en août 2016.

Cette annexe constitue une partie prescriptive de la NIMP 27.

# NIMP 27
# Protocoles de diagnostic pour les organismes nuisibles réglementés

# PD 15: *Citrus tristeza virus*

**Adopté en 2016; publié en 2019**

## TABLE DES MATIÈRES


1. Informations relatives à l'organisme nuisible....3
2. Données taxonomiques....4
3. Détection et identification....4
   - 3.1 Gamme de plantes hôtes....5
   - 3.2 Symptômes....5
   - 3.3 Indexation biologique....6
   - 3.4 Échantillonnage et préparation des échantillons pour les analyses sérologiques et moléculaires....6
   - 3.4.1 Échantillonnage....6
   - 3.4.2 Préparation des empreintes de tissus....7
   - 3.4.2.1 Préparation d'empreintes de tissus pour les analyses sérologiques....7
   - 3.4.2.2 Préparation d'empreintes de tissus et écrasement de pucerons pour les analyses par amplification moléculaire....8
   - 3.4.3 Préparation d'extraits végétaux pour les analyses sérologiques et par amplification moléculaire....8
   - 3.5 Analyses sérologiques....8
   - 3.5.1 Culture directe sur empreinte de tissus - ELISA....9
   - 3.5.2 DAS-ELISA....9
   - 3.6 Analyses moléculaires....10
   - 3.6.1 Purification de l'ARN, immunocapture et synthèse de l'ADNc....11
   - 3.6.1.1 Purification de l'ARN....11
   - 3.6.1.2 Immunocapture....11
   - 3.6.1.3 Synthèse de l'ADNc....11
   - 3.6.2 IC-RT-PCR....11
   - 3.6.3 IC et RT-PCR nichée dans un tube clos unique....11
   - 3.6.4 Considérations générales sur la RT-PCR et la RT-PCR nichée....12
   - 3.6.5 RT-PCR en temps réel....12
   - 3.6.7 Interprétation des résultats des RT-PCR classique et en temps réel....13
   - 3.6.1 Témoins des analyses moléculaires....13
   - 3.6.7.1 RT-PCR classique et IC-RT-PCR....14
   - 3.6.7.2 RT-PCR en temps réel....14
   - 3.7 Validation dans le cadre d'une étude de la performance de l'essai....14

4. Identification des souches agressives de CTV ..... 15
4.1 Indexation biologique ..... 16
4.2 Analyses sérologiques avec MCA13 ..... 16
4.2.1 Culture directe sur empreinte de tissus - ELISA ..... 16
4.2.2 DAS-ELISA ..... 16
5. Données à conserver ..... 16
6. Points de contact pour tout complément d'informations ..... 17
7. Remerciements ..... 17
8. Références ..... 17
9. Figures ..... 21

## 1. Informations relatives à l'organisme nuisible

*Citrus tristeza virus* (CTV) provoque une des maladies les plus préjudiciables à la culture des agrumes, cause d'épidémies ravageuses qui ont pesé sur l'évolution de ce secteur (Moreno *et al.*, 2008). En portugais, le mot «tristeza» signifie «tristesse» ou «mélancolie». Il fait référence au dépérissement que subissent de nombreuses espèces d'agrumes greffées sur *Citrus aurantium* (bigaradier) ou *Citrus limon* (citronnier). La tristeza est une maladie qui touche majoritairement le point de greffe (Román *et al.*, 2004), mais certaines souches de CTV entraînent d'autres syndromes, dont le bois strié sur le tronc, un rabougrissement, des rendements réduits et une baisse de la qualité des fruits chez de nombreux cultivars commerciaux, même s'ils sont greffés sur des porte-greffe tolérants.

CTV est probablement originaire de Malaisie et d'autres pays d'Asie du Sud-Est, zone d'origine présumée des agrumes, et s'est disséminé dans presque tous les pays producteurs d'agrumes au gré des déplacements de matériel végétal infecté. À l'échelle locale, des espèces vectrices de pucerons peuvent prendre le relais de la dissémination et occasionner des épidémies de grande ampleur.

Des pertes d'arbres greffés sur bigaradiers ont d'abord été signalées en Afrique du Sud au début du vingtième siècle, puis dans les années 1930 en Argentine et au Brésil, après l'introduction de plantes infectées par CTV probablement infestées par le puceron vecteur le plus efficace pour transmettre le virus: *Toxoptera citricida* Kirkaldy. En raison du dépérissement dû à CTV, les arbres greffés sur bigaradiers meurent ou cessent de produire des fruits (Bar-Joseph *et al.*, 1989; Cambra *et al.*, 2000a). Des foyers de CTV ont été observés aux États-Unis ainsi que dans certains pays des Caraïbes ou de la Méditerranée (en particulier en Italie et au Maroc). On estime que CTV a touché 38 millions d'arbres sur le continent américain (principalement en Argentine, au Brésil, au Venezuela et aux États-Unis (en Californie)), 60 millions dans le bassin méditerranéen (surtout en Espagne, où près de 50 millions d'arbres ont été infectés) et 5 millions dans les autres régions du monde, soit plus de 100 millions d'arbres au total. La *tristeza* peut être maîtrisée en utilisant comme porte-greffe des espèces d'agrumes qui sont tolérants à CTV. Il existe toutefois des souches agressives du virus qui provoquent des striures du bois chez certains cultivars d'agrumes, quel que soit le porte-greffe utilisé. Ce phénomène a eu des répercussions importantes sur la qualité et le rendement des fruits de plusieurs millions d'arbres infectés par ces souches agressives dans la plupart des zones de culture mondiales, à l'exception du bassin méditerranéen où ces souches sont absentes ou minoritaires. Afin de traiter efficacement la maladie du bois strié, certains secteurs agrumicoles ont adopté une stratégie d'inoculation prophylactique des arbres avec des souches de CTV bénignes; cette approche est également appelée «protection croisée» (Broadbent *et al.*, 1991; da Graça et van Vuuren, 2010).

CTV est le membre le plus fréquent et le plus complexe du genre *Closterovirus* (Moreno *et al.*, 2008). Ses virions sont flexueux et filamenteux et mesurent 2 000 nm de longueur et 11 nm de diamètre; leur génome est composé d'un ARN simple brin non segmenté de polarité positive. Le génome de CTV contient 12 cadres ouverts de lecture (ORF) qui encodent au moins 17 protéines, ainsi que deux régions non traduites (UTR). Les ORF 7 et 8 encodent des protéines identifiées dans les capsides et dont le poids moléculaire est estimé à 27,4 kDa (P27) et 24,9 kDa (P25). La diversité de CTV est plus importante que ce qui avait été escompté: de nouveaux génotypes ont divergé de la population ancestrale ou sont nés de la recombinaison avec des souches déjà décrites (Harper *et al.*, 2008). Les populations de CTV des arbres à agrumes constituent par nature des quasi-espèces, c'est-à-dire un mélange complexe de génotypes viraux et d'ARN viraux incompétents générés au gré de la propagation végétative à long terme des isolats du virus du fait des greffes et du mélange de ces isolats avec ceux que transportent les pucerons vecteurs. Ce phénomène produit des isolats de CTV qui contiennent une population de variantes séquentielles dont l'une est généralement prédominante (Moreno *et al.*, 2008).

En conditions expérimentales, CTV se transmet rapidement par greffage de matériel végétal infecté sur des arbres sains. En conditions naturelles, le virus est transmis par certains pucerons de manière semi-persistante. *T. citricida* est le vecteur de CTV le plus efficace à l'échelle mondiale. Cette espèce

est bien établie en Asie, Australie, Afrique subsaharienne, Amérique centrale et Amérique du Sud ainsi qu'aux Caraïbes, en Floride (États-Unis), dans les régions continentales du nord de l'Espagne et du Portugal ainsi que dans les îles Madère (Ilharco *et al.*, 2005; Moreno *et al.*, 2008). Cela étant, *Aphis gossypii* Glover s'impose comme principal vecteur en Espagne, en Israël, dans certaines régions productrices d'agrumes de la Haute Californie (États-Unis) et dans toutes les zones où *T. citricida* est absent (Yokomi *et al.*, 1989; Cambra *et al.*, 2000a; Marroquín *et al.*, 2004). Gottwald *et al.* (1997) ont comparé les effets des espèces de pucerons vecteurs sur la dissémination de CTV. Il est par ailleurs établi que d'autres espèces de pucerons transmettent aussi CTV (Moreno *et al.*, 2008), parmi lesquelles *Aphis spiraecola* Patch, *Toxoptera aurantii* (Boyer de Fonsicolombe), *Myzus persicae* (Sulzer), *Aphis craccivora* Koch et *Uroleucon jaceae* (Linnaeus). Des expériences de transmission ont démontré que ces espèces, inscrites sur listes, sont des vecteurs moins efficaces de CTV que *T. citricida* et *A. gossypii*. Elles sont toutefois prédominantes dans certaines zones et par conséquent susceptibles d'influencer la dissémination du virus, dans la mesure où leur abondance compense leur faible capacité vectrice (Marroquín *et al.*, 2004).

La dissémination spatiale et temporelle de CTV dans les agrumeraies a fait l'objet d'études dans diverses régions du monde (Gottwald *et al.*, 2002). Ces études démontrent qu'il peut s'écouler un long moment entre l'introduction d'une source primaire d'inoculum de CTV et le déclenchement d'une épidémie de tristeza (Garnsey et Lee, 1988).

## 2. Données taxonomiques

**Nom:** *Citrus tristeza virus* (abréviation: CTV)

**Synonymes:** virus de la tristeza

**Classement taxonomique:** *Closteroviridae*, *Closterovirus*

**Noms communs:** virus de la tristeza, virus de la tristeza des agrumes

## 3. Détection et identification

On peut détecter et identifier CTV au moyen d'analyses biologiques, sérologiques ou par amplification moléculaire (Figures 1 et 2). La détection et l'identification de CTV doivent reposer sur au moins une de ces méthodes, dans le cadre des diagnostics réguliers de l'organisme nuisible dans les pays où il est largement établi. Lorsque l'Organisation nationale de la protection des végétaux (ONPV) exige un degré de confiance supérieur dans l'identification de CTV (en cas de détection dans une zone où le virus n'a pas encore été observé ou de détection dans un envoi provenant d'un pays où l'organisme nuisible est déclaré absent), on devrait effectuer des tests supplémentaires. Quand l'identification initiale repose sur une méthode d'amplification moléculaire, on devrait la compléter par des analyses sérologiques, et inversement. Des essais supplémentaires peuvent aussi être mis en œuvre pour identifier la souche de CTV présente, auquel cas il peut être nécessaire de séquencer l'amplicon de la réaction en chaîne de la polymérase (PCR). Toutes les analyses doivent intégrer des témoins positifs et négatifs pour être considérées comme valides. Les techniques recommandées pour les analyses sérologiques, biologiques et par amplification moléculaire sont décrites dans les sections suivantes. Un diagramme relatif à l'identification des souches de CTV est présenté dans la Figure 2.

Dans le présent protocole de diagnostic, les méthodes (et notamment la mention des noms commerciaux) sont indiquées telles que publiées, car ce sont elles qui définissent les niveaux de sensibilité, spécificité et/ou reproductibilité initialement obtenus. L'emploi de noms de réactifs, produits chimiques ou matériel dans le présent protocole de diagnose n'implique aucune approbation de ceux-ci à l'exclusion d'autres qui peuvent aussi convenir. Les procédures de laboratoire présentées dans les protocoles peuvent être adaptées aux normes des divers laboratoires, sous réserve qu'elles soient validées de façon adéquate.

## 3.1 Gamme de plantes hôtes

En conditions naturelles, CTV infecte facilement la plupart des espèces de *Citrus* et *Fortunella* ainsi que certaines espèces de genres voisins des agrumes appartenant à la famille des Rutaceae, également sensibles à CTV: *Aegle*, *Aeglopsis*, *Afraegle*, *Atalantia*, *Citropsis*, *Clausena*, *Eremocitrus*, *Hespertusa*, *Merrillia*, *Microcitrus*, *Pamburus*, *Pleiospermium* et *Swinglea* (Duran-Vila et Moreno, 2000; Timmer *et al.*, 2000). La majorité des clones de *Poncirus trifoliata* (oranger trifolié) et bon nombre de leurs hybrides, ainsi que *Fortunella crassifolia* (kumquat Meiwa) et certains *Citrus grandis* (pomélo), résistent à la plupart des souches de CTV (Moreno *et al.*, 2008). Par conséquent, dans ces espèces, CTV est absent ou très peu concentré. *Citrus reticulata* (mandarinier), *Citrus sinensis* (oranger doux) et *Citrus latifolia* (limettier) figurent parmi les cultivars les plus sensibles aux infections naturelles par CTV, ainsi que, dans une moindre mesure, les cultivars de *Citrus paradisi* (pamplemoussier), *Citrus unshiu* (mandarinier Satsuma) et *C. limon*. Parmi les espèces utilisées comme porte-greffe, *Citrus macrophylla* (alemow), *Citrus volkameriana* (citronnier Volkamer), *Citrus reshni* (mandarinier Cleopatra) et *Citrus limonia* (limettier Rangpur) sont très sensibles aux infections naturelles par CTV, tandis que les citrangers (hybrides des orangers doux et trifolié) Carrizo et Troyer ainsi que *C. aurantium* sont très rarement infectés. Les porte-greffe *P. trifoliata* et *C. paradisi* × *P. trifoliata* (citrumélo) résistent à la plupart des souches de CTV. Les non-agrumes *Passiflora gracilis* et *Passiflora coerulea* sont étudiés comme hôtes à titre expérimental.

## 3.2 Symptômes

Les symptômes qui se manifestent chez les hôtes infectés par CTV sont très variables et dépendent des conditions environnementales, de l'espèce touchée et de l'agressivité de la souche infectieuse. En outre, le virus peut rester latent pendant plusieurs années. Certaines souches de CTV sont bénignes et ne produisent pas d'effets visibles chez la majorité des espèces d'agrume commerciales, notamment les agrumes greffés sur *C. aurantium*. De manière générale, les mandariniers sont particulièrement tolérants aux infections par CTV. *C. sinensis*, *C. aurantium* (utilisé comme jeune plant et non comme porte-greffe), *Citrus jambhiri* (citronnier rugueux) et *C. limonia* demeurent habituellement asymptomatiques après l'infection, mais peuvent toutefois manifester une réaction à certaines souches agressives. Des symptômes d'infection apparaîtront probablement chez le limettier, le pamplemoussier, certains cultivars du pomélo, l'alemow, l'oranger doux, quelques hybrides d'agrumes et les espèces voisines des agrumes de la famille des Rutaceae indiquées à la section 3.1.

En fonction de la souche de CTV, des espèces d'agrume ou de l'association greffon/porte-greffe, il se peut que le virus ne provoque aucun symptôme ou entraîne l'un des trois symptômes suivants: tristeza, bois strié, ou jaunisse des jeunes plants (principalement sous serre). Ces trois syndromes sont décrits dans les paragraphes qui suivent. La Figure 1 récapitule les principaux symptômes induits par CTV.

L'une des conséquences de CTV les plus importantes sur le plan économique est la tristeza (maladie du point de greffe), caractérisée par un dépérissement des arbres greffés sur des bigaradiers ou des citronniers. Les orangers doux, mandariniers et pamplemoussiers greffés sur ces porte-greffe dépérissent lentement: ils se rabougrissent, deviennent chlorosés et finissent souvent par mourir au bout de plusieurs mois ou années. En revanche, d'autres greffons dépérissent rapidement ou se ratatinent quelques jours seulement après l'apparition des premiers symptômes. Le dépérissement est dû aux effets physiologiques du virus sur le phloème du porte-greffe sensible, juste en dessous du point de greffe. Les arbres qui dépérissent lentement présentent typiquement un renflement au-dessus du point de greffe, une ligne brune à la jonction et des striures inversées ou des piqûres pouvant former un motif de nid d'abeilles sur la face intérieure de l'écorce du porte-greffe du bigaradier. Les symptômes couramment observés chez les hôtes sensibles sont un rabougrissement, un repliement des feuilles, un éclaircissement des nervures, une chlorose foliaire, le bois strié et la réduction de la taille des fruits. Cependant, certains isolats du virus, en particulier dans les zones productrices d'agrumes du bassin méditerranéen, n'entraînent de symptômes de dépérissement que plusieurs années après l'infection, même chez les arbres greffés sur bigaradiers.

Les souches agressives de CTV peuvent toucher sévèrement les arbres et provoquer des striures du bois au niveau du tronc et des branches du limettier, du pamplemoussier et de l'oranger doux. Le bois strié peut parfois donner l'aspect d'une corde ou bosseler le tronc et les branches charpentières des arbres adultes, creuser des cavités profondes dans le bois sous les parties touchées de l'écorce et réduire la qualité et le rendement des fruits. Les porte-greffe de l'alemow sont sévèrement touchés par la plupart des souches de CTV: le virus y provoque des striures du bois qui affaiblissent l'arbre.

La jaunisse des jeunes plants est caractérisée par un dépérissement, la production de feuilles pâles ou chlorosées, le développement réduit du système radiculaire et l'arrêt de la croissance des arbres greffés sur des jeunes plants de bigaradier, pamplemoussier et citronnier cultivés en serre (20-26 °C).

## 3.3 Indexation biologique

L'indexation biologique vise à détecter la présence de CTV dans des obtentions, des sélections ou des échantillons dont on souhaite évaluer l'état sanitaire, et à estimer l'agressivité de l'isolat sur de jeunes plants de *Citrus aurantifolia* (limettier mexicain, Key ou Omani), *C. macrophylla* ou *Citrus paradisi* Macfadyen (pamplemoussier Duncan). La plante indicatrice est un greffon inoculé selon les méthodes classiques et entretenu dans des conditions usuelles (Roistacher, 1991), l'essai se faisant sur quatre à six réplicats (ou deux ou trois réplicats s'il n'est pas possible d'obtenir davantage d'échantillons). L'éclaircissement des nervures des jeunes feuilles, le repliement ou la distorsion des feuilles, des entre-nœuds raccourcis, les striures du bois ou les symptômes de jaunisse des jeunes plants constituent chacun une preuve de l'infection par CTV du greffon inoculé chez les plantes indicatrices sensibles. On compare les symptômes qui apparaissent sur les échantillons à ceux des témoins positifs et négatifs. Des illustrations des symptômes causés par CTV sur les plantes indicatrices sont fournies par Roistacher (1991) et Moreno *et al.* (2008).

L'indexation biologique est largement employée dans les systèmes de certification, car cette méthode est jugée sensible et fiable pour la détection des souches de CTV nouvelles ou inhabituelles. Elle présente néanmoins quelques inconvénients: ce n'est pas un test rapide (l'apparition des symptômes a lieu trois à six mois après l'inoculation); elle ne peut s'appliquer qu'aux greffons; elle requiert des installations spéciales telles que des serres à température contrôlée inaccessibles aux insectes; et elle nécessite du personnel consacré à la culture des plantes hôtes indicatrices saines et vigoureuses qui présenteront les symptômes attendus, ainsi que du personnel expérimenté capable d'interpréter avec exactitude les symptômes observés susceptibles d'être confondus avec ceux que provoquent d'autres agents transmissibles par greffe. En outre, les souches asymptomatiques de CTV qui n'induisent aucun symptôme (souches latentes) ne sont pas détectables par la méthode des plantes indicatrices (par exemple la souche K décrite par Albertini *et al.* (1988)).

Peu de données quantitatives ont été publiées concernant les paramètres diagnostiques (notamment la spécificité, la sensibilité) et la fiabilité des essais biologiques fondés sur le greffage de plantes indicatrices (indexation) pour la détection, la diagnose et l'identification de CTV. Cambra *et al.* (2002), dans le cadre du projet européen sur les protocoles de diagnostic (DIAGPRO), ainsi que Vidal *et al.* (2012) ont comparé l'indexation du limettier mexicain à l'essai de culture directe sur empreinte de tissus - ELISA (section 3.5.1) (avec les anticorps monoclonaux 3DF1 + 3CA5) et à l'essai de culture sur empreinte de tissu - transcription inverse suivie d'amplification en chaîne par polymérase (RT-PCR) (section 3.6.5) et ont conclu que, pour détecter CTV, ces deux méthodes en laboratoire pouvaient se substituer à la méthode classique d'indexation du limettier mexicain en conservant la même exactitude.

## 3.4 Échantillonnage et préparation des échantillons pour les analyses sérologiques et moléculaires

### 3.4.1 Échantillonnage

Des orientations générales sur les méthodes d'échantillonnage sont fournies dans la NIMP 31 (*Méthodes d'échantillonnage des envois*) et, plus spécifiquement concernant la détection de CTV,

dans Cambra *et al.* (2002). Il est essentiel d'effectuer un échantillonnage approprié pour la détection et l'identification de CTV au moyen de méthodes biologiques, sérologiques ou d'amplification moléculaire. La modification d'un plan d'échantillonnage approuvé pourrait donner lieu à des faux positifs ou faux négatifs même si le protocole de diagnostic suivi est efficace. Pour les arbres adultes, l'échantillon normalisé est constitué de cinq jeunes pousses ou pédoncules de fruits, dix feuilles complètement développées, ou cinq fleurs ou fruits prélevés autour de la cime de chaque arbre sur chacune des charpentières. Dans les zones méditerranéennes tempérées, les échantillons (pousses ou feuilles entièrement développées + pédoncules) peuvent être prélevés à tout moment de l'année sur des orangers doux, mandariniers, citronniers et pamplemoussiers, mais, dans les zones tropicales et subtropicales, il faut idéalement les prélever au printemps ou à l'automne afin de détecter des concentrations élevées de CTV. Dans ces climats, on observe une baisse de concentration de CTV dans les mandariniers Satsuma pendant l'été, c'est pourquoi il est recommandé d'échantillonner pendant les périodes de végétation, à l'exception des journées estivales les plus chaudes (35-40 °C). Il est néanmoins possible d'échantillonner les racines pendant les périodes chaudes, si besoin est. Les fleurs et les fruits (le cas échéant) conviennent également pour l'échantillonnage (Cambra *et al.*, 2002). L'échantillon de fruit qui convient le mieux est le tissu du pédoncule près de l'albédo, là où le pédoncule est attaché au fruit, ou le tissu de la columelle. Le prélèvement de deux jeunes pousses ou quatre feuilles par plante fat généralement partie des exigences relatives à l'échantillonnage de plantes de pépinière. Généralement, pour réaliser l'indexation de Roistacher (1991), des copeaux exempts de bourgeons (petits morceaux d'écorce sans bourgeons), voire des feuilles de plantes infectées, sont prélevés à tout moment de l'année (mais de préférence pendant la période de végétation) sur des pousses ou des branches âgées d'au moins un an.

Les pousses, les pétioles de feuilles, les pédoncules de fruits et les fleurs peuvent être stockés à 4 °C environ jusqu'à sept jours avant leur traitement. Les fruits peuvent être conservés pendant un mois à près de 4 °C. Au-delà de ces limites, les analyses peuvent mesurer des concentrations moindres et les méthodes de diagnostic peuvent obtenir des faux négatifs.

Les échantillons composites devant être analysés dans un même lot peuvent être prélevés ensemble (généralement deux feuilles ou une pousse sur une à dix plantes de pépinière, ou dix feuilles ou cinq pousses prélevées autour de la cime par arbre adulte) aux fins des essais sérologiques et de l'amplification moléculaire. Dans certaines circonstances (par exemple le dépistage régulier de CTV quand le virus est largement établi dans un pays ou une zone), on peut tester plusieurs plantes simultanément à l'aide d'un échantillon composite constitué à partir de plusieurs individus. La décision d'analyser des échantillons de plantes individuelles ou des échantillons composites regroupant plusieurs plantes selon des méthodes sérologiques ou d'amplification moléculaire dépend de la concentration virale dans les plantes, de la prévalence de CTV attendue dans la zone concernée (Vidal *et al.*, 2012), de la limite de détection de la méthode d'essai envisagée et du niveau de confiance exigé par l'ONPV.

Les pucerons (frais ou conservés dans de l'alcool à 70 %) peuvent être testés individuellement pour dépister CTV. Ils sont collectés directement dans des colonies existantes ou à l'aide de pièges: on recommande à cet effet les pièges à succion, les pièges à eau jaunes classiques de Moericke ou les pièges collants sur les pousses. Idéalement, les spécimens collectés sont écrasés et analysés par RT-PCR en temps réel (Bertolini *et al.*, 2008) ou une autre méthode d'amplification moléculaire (Marroquín *et al.*, 2004).

### 3.4.2 Préparation des empreintes de tissus

#### 3.4.2.1 Préparation d'empreintes de tissus pour les analyses sérologiques

Sectionner nettement les pousses tendres, les pétioles de feuilles, les pédoncules de fruits ou les ovaires de fleurs. Presser délicatement les sections fraîchement coupées sur une membrane de nitrocellulose ou d'ester de cellulose (0,45 mm), puis laisser sécher la trace ou l'empreinte pendant 2-5 min. Pour les essais sérologiques de routine, on devrait réaliser au moins deux empreintes par

pousses (une pour chaque extrémité de la pousse) ou par pédoncule, ou une empreinte par pétiole de feuille ou par ovaire de fleur. Les membranes sur lesquelles les tissus ont été pressés peuvent être conservées plusieurs mois dans un endroit sec et sombre.

#### 3.4.2.2 Préparation d'empreintes de tissus et écrasement de pucerons pour les analyses par amplification moléculaire

Il est recommandé de prélever le matériel végétal à la main afin d'éviter de contaminer les échantillons avec les ciseaux. Prélever des pousses tendres dotées de feuilles pleinement développées ou des feuilles matures autour de la cime de l'arbre. Presser directement le pétiole de deux feuilles ou deux pousses sur du papier Whatman[1] 3MM (0,45 mm) ou sur une membrane en nylon chargée positivement. Effectuer plusieurs empreintes qui se chevauchent partiellement avec différentes feuilles sur environ 0,5 $cm^2$ de papier ou de membrane, conformément aux instructions de Bertolini *et al.* (2008). Laisser sécher la trace ou l'empreinte pendant 2-5 min. S'agissant des analyses par amplification moléculaire de routine, on devrait effectuer une empreinte par pédicelle foliaire sélectionné. Écraser chaque puceron individuellement directement sur du papier Whatman[1] 3MM ou une membrane en nylon chargée positivement à l'aide de la base arrondie d'un tube Eppendorf[1], jusqu'à ce que chaque spécimen soit totalement désagrégé (Bertolini *et al.*, 2008). Les membranes portant les empreintes ou les échantillons écrasés peuvent être conservées plusieurs mois dans un endroit sec et sombre.

Les méthodes directes de préparation des échantillons (empreinte de tissus ou écrasement) sans passer par un extrait sont validées comme substituts à l'approche classique comprenant une étape d'extraction avant l'analyse des échantillons (Vidal *et al.*, 2012).

### 3.4.3 Préparation d'extraits végétaux pour les analyses sérologiques et par amplification moléculaire

Couper du matériel végétal frais (0,2-0,5 g) en petits morceaux à l'aide de lames de rasoir jetables ou de ciseaux traités à l'eau de javel afin d'éviter les contaminations croisées entre échantillons, puis placer ces morceaux dans un tube ou un sachet en plastique adéquat. Les extraits destinés à l'analyse sérologique peuvent être préparés dans les tubes ou les sachets en plastique. S'agissant de l'amplification moléculaire, on ne devrait préparer les échantillons que dans des sachets en plastique individuels en vue d'éviter une contamination croisée. Homogénéiser parfaitement l'échantillon dans 4-10 ml (1:20 m/v, sauf mention contraire du fabricant) de tampon d'extraction avec un homogénéisateur de tissus électrique, un rouleau manuel, un marteau ou un outil similaire. Le tampon d'extraction est constitué de tampon phosphate salin (PBS) à pH 7,2-7,4 ($NaCl_2$, 8 g; KCl, 0,2 g; $Na_2HPO_4 \cdot 12H_2O$, 2,9 g; $KH_2PO_4$, 0,2 g; eau distillée, 1 litre) contenant 0,2 % de diéthyldithiocarbamate de sodium (DIECA) ou de mercaptoéthanol, ou d'un autre tampon validé de manière adéquate.

## 3.5 Analyses sérologiques

Il est hautement recommandé d'effectuer un essai ELISA faisant appel à des anticorps monoclonaux ou polyclonaux pour détecter et identifier CTV dans un grand nombre d'échantillons. La production d'anticorps monoclonaux spécifiques à CTV (Vela *et al.*, 1986; Permar *et al.*, 1990), dont Nikolaeva *et al.* (1996) ont dressé le bilan, a résolu le problème de spécificité diagnostique des anticorps polyclonaux (Cambra *et al.*, 2011) et ainsi accru la sensibilité diagnostique des analyses sérologiques.

[1] Dans le présent protocole de diagnose, les méthodes (et notamment la mention des noms commerciaux) sont indiquées telles que publiées, car ce sont elles qui définissent les niveaux de sensibilité, spécificité et/ou reproductibilité initialement obtenus. L'emploi de noms de réactifs, produits chimiques ou matériel dans le présent protocole de diagnose n'implique aucune approbation de ceux-ci à l'exclusion d'autres qui peuvent aussi convenir. Les procédures de laboratoire présentées dans les protocoles peuvent être adaptées aux normes des divers laboratoires, sous réserve qu'elles soient validées de façon adéquate.

Un mélange des deux anticorps monoclonaux 3DF1 et 3CA5, ou de leurs versions recombinantes (Terrada *et al.*, 2000), reconnaît la totalité des isolats de CTV provenant de collections internationales testés (Cambra *et al.*, 1990). On trouvera une description détaillée de cette méthode ainsi qu'une caractérisation et la validation de ces anticorps monoclonaux dans Cambra *et al.* (2000a). Zebzami *et al.* (1999) indiquent qu'un mélange des anticorps monoclonaux 4C1 et 1D12 produit au Maroc réagit avec un large spectre de souches de CTV, mais aucune donnée de validation n'est disponible.

### 3.5.1 Culture directe sur empreinte de tissus - ELISA

Effectuer la culture directe sur empreinte de tissus combinée à un essai ELISA, également appelée immuno-empreinte ELISA ou DTBIA (*direct tissue blot immunoassay*), conformément à Garnsey *et al.* (1993) et Cambra *et al.* (2000b) en suivant la méthode décrite ci-dessous. Un kit complet (validé par des évaluations de la performance et par diverses études publiées) reposant sur les anticorps monoclonaux spécifiques à CTV 3DF1 + 3CA5 (Vela *et al.*, 1986), qui comprend des membranes portant déjà les empreintes des témoins positif et négatif ainsi que l'ensemble des réactifs et tampons et le substrat, est disponible auprès de Plant Print Diagnòstics SL[1]. Un kit similaire fondé sur les anticorps 4C1 et 1D12 préconisés par Zebzami *et al.*, (1999) est commercialisé par Agdia[1], mais il n'a pas été validé.

Placer les membranes et leurs empreintes de tissus (taille recommandée: environ 7 × 13 cm) dans un récipient approprié (bac, conteneur hermétique ou sachet en plastique), les recouvrir avec une solution d'albumine sérique bovine à 1 % (BSA) dans de l'eau distillée et incuber pendant 1 h à température ambiante ou jusqu'au lendemain (environ 16 h) à 4 °C, cette dernière option étant recommandée. Une légère agitation favorise cette étape. Éliminer la solution de BSA en conservant les membranes dans le même récipient. Préparer une solution de conjugué contenant les anticorps monoclonaux spécifiques à CTV 3DF1 + 3CA5 associés à la phosphatase alcaline (en concentrations égales, soit environ 0,1 µg/ml de chaque anticorps monoclonal dans du PBS), ou bien les protéines de fusion 3DF1 scFv-AP/S + 3CA5 scFv-AP/S exprimées par *Escherichia coli* diluées comme il convient dans du PBS (Terrada *et al.*, 2000). Recouvrir les membranes avec la solution de conjugué, puis incuber pendant 3 h à température ambiante en agitant légèrement. Éliminer la solution de conjugué. Rincer les membranes et le récipient avec le tampon de lavage (PBS à pH 7,2-7,4 contenant 0,05 % de Tween 20), et laver en agitant manuellement ou mécaniquement durant 5 min. Éliminer le tampon de lavage et répéter deux fois le processus de lavage. Verser le substrat de la phosphatase alcaline (les comprimés *Fast* BCIP/NBT (5-bromo-4-chloro-3-indolyl-phosphate/nitrobleu de tétrazolium) de Sigma[1] donnent, d'après le fabricant, des concentrations finales de 0,33 mg/ml pour NBT et 0,175 mg/ml pour BCIP) sur les membranes, puis incuber jusqu'à l'apparition d'une coloration pourpre-violet dans les témoins positifs (soit environ 10-15 min). Arrêter la réaction en lavant les membranes avec de l'eau du robinet. Étaler les membranes sur du papier absorbant et laisser sécher. Examiner les empreintes à faible grossissement (facteur 10-20). La présence d'un précipité pourpre-violet dans la zone vasculaire du matériel végétal indique la présence de CTV.

### 3.5.2 DAS-ELISA

Mettre en œuvre l'essai ELISA à deux anticorps en sandwich (DAS-ELISA) conçu par Garnsey et Cambra (1991) en suivant la méthode décrite ci-dessous. Il existe des kits complets contenant les anticorps monoclonaux spécifiques à CTV 3DF1 + 3CA5 déjà validés (Plant Print Diagnòstics SL[1]) ou différents anticorps polyclonaux (Agdia[1], Agritest[1], Bioreba[1], Loewe[1], Sediag[1]).

Placer chaque échantillon dans deux puits d'une plaque microtitre, et prévoir au moins deux puits par témoin (positif et négatif). Diluer les anticorps polyclonaux ou monoclonaux (3DF1 + 3CA5) comme il convient (généralement 1-2 µg/ml d'immunoglobulines totales) dans un tampon carbonate à pH 9,6 ($Na_2CO_3$, 1,59 g; $NaHCO_3$, 2,93 g; eau distillée, 1 litre), et verser 200 µl de dilution dans chaque puits. Incuber la plaque pendant 4 h à 37 °C ou jusqu'au lendemain (environ 16 h) à 4 °C. Laver les puits trois fois avec le tampon de lavage (PBS à pH 7,2-7,4 contenant 0,05 % de Tween 20). Ajouter 200 µl d'extrait végétal (voir section 3.4.3) dans chaque puits. Incuber pendant 16 h à 4 °C, puis laver les

plaques trois fois en suivant la même méthode que pour l'essai de culture directe sur empreinte de tissus - ELISA (section 3.5.1). Diluer comme il convient (environ 0,1 µg/ml dans du PBS contenant 0,5 % de BSA) les mélanges d'anticorps polyclonaux ou monoclonaux (3DF1 + 3CA5) spécifiques conjugués à la phosphatase alcaline, puis ajouter 200 µl de dilution dans chaque puits. Incuber pendant 3 h à 37 °C. Laver à nouveau les plaques en suivant la même méthode que pour l'essai de culture directe sur empreinte de tissus - ELISA (section 3.5.1). Préparer une solution de 1 mg/ml de phosphatase alcaline (p-nitrophénylphosphate) dans le tampon substrat (97 ml de diéthanolamine dans 800 ml d'eau distillée, pH ajusté à 9,8 avec du HCl concentré, volume total amené à 1 litre avec de l'eau distillée); ajouter 200 µl de cette solution dans chaque puits. Incuber les plaques à température ambiante en mesurant la densité optique (DO) des puits à 405 nm à intervalle régulier pendant 120 min, ou en suivant les instructions du fabricant de l'anticorps polyclonal utilisé.
Le test ELISA est jugé négatif si la DO moyenne de chaque puits de l'échantillon en duplicata est < 0,1 ou bien < 2 × la DO moyenne obtenue avec les témoins négatifs composés d'extraits de plantes saines. Le test ELISA est jugé positif si la DO moyenne de chaque puits de l'échantillon en duplicata est ≤ 2 × la DO moyenne obtenue avec les témoins négatifs composés d'extraits de plantes saines. Si l'essai repose sur des anticorps polyclonaux, il est essentiel d'opter pour des témoins négatifs aussi similaires que possible à la matrice analysée sur la même plaque.

La méthode fondée sur les anticorps monoclonaux 3DF1 + 3CA5 a été validée par un essai circulaire dans le cadre du projet DIAGPRO (Cambra *et al.*, 2002). La section 3.7 fournit les paramètres diagnostiques et compare la présente méthode à d'autres techniques.

Il existe des mélanges d'anticorps monoclonaux qui détectent toutes les souches de CTV avec une spécificité, une sensibilité et une fiabilité satisfaisantes, mais certains anticorps polyclonaux ne sont pas spécifiques et offrent une sensibilité limitée (Cambra *et al.*, 2011). C'est la raison pour laquelle il est recommandé d'appliquer des méthodes supplémentaires lorsque l'analyse repose sur des anticorps polyclonaux et quand l'ONPV exige un niveau de confiance supplémentaire dans l'identification de CTV.

## 3.6 Analyses moléculaires

L'élucidation de la séquence nucléotidique complète de l'ARN génomique de CTV a permis de mettre au point diverses procédures diagnostiques fondées sur la détection spécifique de l'ARN viral, notamment des méthodes d'hybridation moléculaire faisant appel à des sondes à acide nucléique complémentaire (ADNc ou ARNc) ainsi que plusieurs essais de type RT-PCR (Moreno *et al.*, 2008). Les méthodes RT-PCR ont considérablement amélioré la sensibilité de la détection, permettant de quantifier les copies d'ARN viral dans les tissus infectés des agrumes ou chez les espèces de pucerons virulifères de CTV (Bertolini *et al.*, 2008). Une technique à haut débit comme la RT-PCR en temps réel permet d'éviter les traitements post-amplification (par exemple électrophorèse sur gel), ce qui la rend plus rapide et moins vulnérable aux contaminations croisées que la PCR classique.

On devrait extraire l'ARN en suivant les protocoles validés appropriés, sauf dans le cas du protocole combinant immunocapture et RT-PCR (IC-RT-PCR), qui ne requiert pas d'isolement de l'acide nucléique. Les échantillons devraient être placés dans des sachets en plastique individuels en vue d'éviter la contamination croisée pendant l'extraction. Une autre solution consister à analyser des gouttes d'extraits de plantes, des empreintes de sections de tissu ou du matériel végétal écrasé par immobilisation sur du papier buvard ou des membranes en nylon puis RT-PCR en temps réel (Bertolini *et al.*, 2008). Si une PCR classique est employée, il est déconseillé d'analyser l'échantillon sous forme de gouttes d'extrait ou d'empreintes de tissus, car cette méthode PCR est moins sensible que la RT-PCR en temps réel et peut donner de faux négatifs.

### 3.6.1 Purification de l'ARN, immunocapture et synthèse de l'ADNc

#### 3.6.1.1 Purification de l'ARN

On devrait purifier l'ARN selon des protocoles validés comme il convient ou au moyen d'un kit de purification de l'ARN, en suivant les instructions du fabricant. L'ARN extrait devrait être conservé à −70 °C (de préférence) ou −20 °C jusqu'à ce qu'il serve de matrice, pendant un an maximum. On devrait le stocker en petites quantités afin d'éviter de multiplier les cycles de décongélation-recongélation susceptibles de dégrader l'ARN.

#### 3.6.1.2 Immunocapture

L'immunocapture est une option de substitution à la purification de l'ARN. Cette procédure fait appel à un mélange d'anticorps dilué composé comme suit: 1 µg/ml d'anticorps polyclonaux spécifiques à CTV ou de dilution d'anticorps monoclonaux (3DF1 + 3CA5, 0,5 µg/ml + 0,5 µg/ml) dans un tampon carbonate à pH 9,6 (cf. section 3.5.2 pour la composition du tampon carbonate). Verser respectivement 100 µl du mélange d'anticorps dans des microtubes ensuite incubés pendant 3 h à 37 °C. Laver les tubes ainsi revêtus deux fois avec 150 µl de tampon de lavage stérile (PBS à pH 7,2-7,4 contenant 0,05 % de Tween 20; cf. section 3.4.3 pour la composition du PBS). On peut clarifier l'extrait végétal (100 µl) par centrifugation ou filtration sur papier filtre (étape facultative), ou verser directement des aliquotes de l'extrait brut dans les microtubes revêtus avec les anticorps. Incuber les tubes pendant au moins 2 h sur la glace ou pendant 2 h à 37 °C. Après l'étape d'immunocapture, laver les microtubes trois fois avec 150 µl de tampon de lavage stérile. La synthèse de l'ADNc et la PCR sont réalisées dans les tubes ainsi lavés.

#### 3.6.1.3 Synthèse de l'ADNc

Dans la mesure où la conservation de l'ARN stocké est problématique, il est recommandé de synthétiser l'ADNc, qui se conserve plus longtemps que l'ARN et se montre moins sensible aux températures. Plusieurs kits sont en vente pour synthétiser l'ADNc.

### 3.6.2 IC-RT-PCR

Olmos *et al.* (1999) proposent les amorces suivantes:

PIN1: 5′-GGT TCA CGC ATA CGT TAA GCC TCA CTT-3′

PIN2: 5′-TAT CAC TAG ACA ATA ACC GGA TGG GTA -3′

Le mélange RT-PCR a la composition suivante: eau ultrapure, 14,3 µl; tampon ADN polymérase Taq 10×, 2,5 µl; $MgCl_2$ à 25 mM, 1,5 µl; dNTP à 5 mM, 1,25 µl; Triton X-100 à 4 %, 2 µl; amorce PIN1 à 25 µM, 1 µl; amorce PIN2 à 25 µM, 1 µl; diméthylsulfoxyde (DMSO), 1,25 µl; transcriptase inverse AMV (10 U/µl), 0,1 µl; et ADN polymérase Taq (5 U/µl), 0,1 µl. Ajouter directement 25 µl de mélange réactionnel dans les microtubes revêtus avec les anticorps. Les paramètres de thermocyclage de la RT-PCR sont: 45 min à 42 °C; 2 min à 92 °C; 40 cycles de 30 s à 92 °C, 30 s à 60 °C et 1 min à 72 °C; élongation finale de 10 min à 72 °C; refroidissement à 8 °C. L'amplicon attendu comporte 131 paires de bases (pb).

Cette méthode a été validée par un essai circulaire dans le cadre du projet DIAGPRO (Cambra *et al.*, 2002). La section 3.7 fournit les paramètres diagnostiques et compare la méthode IC-RT-PCR à d'autres techniques.

### 3.6.3 IC et RT-PCR nichée dans un tube clos unique

Olmos *et al.* (1999) proposent les amorces suivantes:

PEX1: 5′-TAA ACA CAC ACT CTA AGG-3'

PEX2: 5′-CAT CTG ATT GAA GTG GAC-3'

PIN1: 5′-GGT TCA CGC ATA CGT TAA GCC TCA CTT-3’

PIN2: 5′-TAT CAC TAG ACA ATA ACC GGA TGG GTA-3’

Le dispositif de compartimentalisation du microtube de 0,5 ml servant à la RT-PCR nichée dans un tube clos unique est indiqué dans Olmos *et al.* (1999). Le mélange principal de la RT-PCR comprend deux mélanges réactionnels:

**A** (déposé au fond du microtube): eau ultrapure, 15,8 µl; tampon ADN polymérase Taq 10×, 3 µl; $MgCl_2$ à 25 mM, 3,6 µl; dNTP à 5 mM, 2 µl; Triton X-100 à 4 %, 2,2 µl; amorce PEX1 à 25 µM, 0,6 µl; amorce PEX2 à 25 µM, 0,6 µl; DMSO, 1,5 µl; transcriptase inverse AMV (10 U/µl), 0,2 µl; et ADN polymérase Taq (5 U/µl), 0,5 µl.

**B** (placé dans le cône): eau ultrapure, 2,6 µl; tampon ADN polymérase Taq 10×, 1 µl; amorce PIN1 à 25 µM, 3,2 µl; amorce PIN2 à 25 µM, 3,2 µl.

Les paramètres de thermocyclage de la RT-PCR sont: 45 min à 42 °C; 2 min à 92 °C; 25 cycles de 30 s à 92 °C, 30 s à 45 °C et 1 min à 72 °C. À l’issue de cette première étape, agiter le tube sur vortex puis centrifuger (6 000 tours/minutes pendant 5 s) afin de mélanger la solution B avec les produits de la première amplification. Replacer le tube dans le thermocycleur avec le paramétrage suivant: 40 cycles de 30 s à 92 °C, 30 s à 60 °C et 1 min à 72 °C; élongation finale de 10 min à 72 °C; refroidissement à 8 °C. L’amplicon attendu mesure 131 pb.

Cette méthode a été validée par un essai circulaire dans le cadre du projet DIAGPRO (Cambra *et al.*, 2002). La section 3.7 fournit les paramètres diagnostiques et compare cette méthode à d’autres techniques.

### 3.6.4 Considérations générales sur la RT-PCR et la RT-PCR nichée

Le laboratoire peut être amené à modifier (optimiser) les protocoles RT-PCR s’il utilise des réactifs ou des thermocycleurs différents.

Si la détection de CTV repose sur une RT-PCR classique, c’est la méthode IC-RT-PCR qui est recommandée. En effet, sans immunocapture la RT-PCR classique n’est pas sensible et peut donner des faux négatifs. Il est possible que la présence d’inhibiteurs affecte la sensibilité de la RT-PCR classique.

Le résultat est négatif quand tous les témoins positifs produisent l’amplicon de la taille correcte de CTV, mais pas l’échantillon. Le résultat est positif quand l’échantillon produit l’amplicon de la taille correcte de CTV, sous réserve qu’aucun des témoins négatifs ne soit amplifié.

### 3.6.5 RT-PCR en temps réel

Deux essais RT-PCR en temps réel ont été décrits, l’un par Bertolini *et al.* (2008) et l’autre par Saponari *et al.* (2008).

Bertolini *et al.* (2008) proposent les amorces et la sonde suivantes:

3′UTR1: 5′-CGT ATC CTC TCG TTG GTC TAA GC-3′

3′UTR2: 5′-ACA ACA CAC ACT CTA AGG AGA ACT TCT T-3′

181T: FAM-TGG TTC ACG CAT ACG TTA AGC CTC ACT TG-TAMRA

Le volume réactionnel final vaut 25 µl. Le mélange de la RT-PCR en temps réel est composé ainsi: eau ultrapure, 0,95 µl; AgPath-ID One-Step RT-PCR Master Mix 2× (Applied Biosystems[1]), 12,5 µl; mélange d’enzymes RT-PCR 25×, 1 µl; amorce 3′UTR1 à 10 µM, 2,4 µl; amorce 3′UTR2 à 10 µM, 2,4 µl; sonde 181T marquée avec FAM (5 µM), 0,75 µl. Ajouter 5 µl d’ARN extrait ou libéré à partir d’une membrane aux 20 µl de mélange RT-PCR en temps réel. Les paramètres de thermocyclage

sont: 10 min à 45 °C; 10 min à 95 °C; 45 cycles de 15 s à 95 °C, 1 min à 60 °C. L'amplicon attendu mesure 95 pb.

Si la RT-PCR en temps réel est effectuée sur des empreintes de tissu, la sensibilité diagnostique est estimée à 0,98, la spécificité à 0,85, et les rapports de vraisemblance positif et négatif à 6,63 et 0,021 respectivement (Vidal *et al.*, 2012). Ces paramètres diagnostiques montrent que la RT-PCR en temps réel sur empreinte de tissus est plus sensible que la culture directe sur empreinte de tissus combinée à ELISA. Ce constat valide l'application de la RT-PCR sur empreinte de tissus pour la détection et la diagnose de routine de CTV, méthode fortement recommandée pour déterminer si un matériel végétal est infecté. La sensibilité élevée de cette technique permet d'analyser avec exactitude des échantillons composites (lots regroupant jusqu'à dix arbres ou plantes de pépinière) pour un diagnostic unique, en toute saison, et de dépister CTV chez diverses espèces de pucerons même à faible concentration. Pour obtenir des paramètres diagnostiques supplémentaires relatifs à la validation de la RT-PCR en temps sur empreinte de tissu, voir la section 3.7.

Saponari *et al.* (2008) proposent les amorces et la sonde suivantes:

P25F: 5′-AGC RGT TAA GAG TTC ATC ATT RC-3′

P25R: 5′-TCR GTC CAA AGT TTG TCA GA-3′

CTV-CY5: CY5-CRC CAC GGG YAT AAC GTA CAC TCG G

Le volume réactionnel final vaut 25 µl. Le mélange de la RT-PCR en temps réel est composé ainsi: eau ultrapure, 6,6 µl; iScript One-Step RT-PCR Kit for Probes 2× (Bio-Rad1), 12,5 µl; iScript Reverse Transcription Supermix, 0,5 µl; amorce P25F à 10 µM, 1 µl; amorce P25R à 10 µM, 2 µl; sonde CTV-CY5 à 5 µM, 0,4 µl; et 2 µl d'ARN extrait ou libéré à partir d'une membrane, mis en présence de 23 µl de mélange RT-PCR en temps réel. Les paramètres de thermocyclage sont: 2 min à 55 °C; 5 min à 95 °C; 40 cycles de 15 s à 95 °C, 30 s à 59 °C. L'amplicon attendu mesure 101 pb.

Les paramètres diagnostiques (sensibilité, spécificité, exactitude, rapports de vraisemblance positif et négatif, probabilité de maladie après l'essai) ne sont pas disponibles pour ce protocole de RT-PCR en temps réel.

### 3.6.7 Interprétation des résultats des RT-PCR classique et en temps réel

### 3.6.1 Témoins des analyses moléculaires

Pour que les résultats des analyses soient considérés comme fiables, des témoins adaptés – qui dépendront du type d'analyse réalisée et du degré de certitude requis – devraient être intégrés dans chaque série d'isolements d'acide nucléique et d'amplifications d'acide nucléique de l'organisme nuisible ciblé. Pour la RT-PCR, un acide nucléique témoin positif et un témoin négatif de l'amplification (témoin exempt de matrice) sont, au minimum, les témoins qui devraient être employés.

**Acide nucléique témoin positif.** Ce témoin sert à contrôler l'efficacité de la méthode d'essai (sans tenir compte de l'extraction), et, s'agissant d'une RT-PCR, de l'amplification. On peut à cet effet employer de l'ARN préparé au préalable et stocké, ou du matériel végétal infecté avec CTV et pressé sur membrane. L'ARN stocké ou les préparations infectées devraient faire l'objet de vérifications régulières en vue de contrôler la qualité du témoin quand le stockage se prolonge.

**Témoin interne.** On pourrait inclure l'ARN messager du gène mitochondrial *NADH dehydrogenase* 5 (*nad5*) comme témoin interne dans le protocole de RT-PCR en temps réel présenté par Saponari *et al.* (2008) afin d'éliminer l'éventualité d'obtenir des faux négatifs dus à une mauvaise extraction ou à la dégradation de l'acide nucléique, ou encore à la présence d'inhibiteurs de RT-PCR. Comme *nad5* est une cible, on devrait prendre soin de ne pas contaminer le laboratoire avec cet acide nucléique, car une contamination pourrait fausser l'interprétation de la réaction du témoin interne.

**Témoin négatif de l'amplification (témoin exempt de matrice).** Ce témoin est nécessaire pour les méthodes de RT-PCR classique et en temps réel, afin d'éliminer l'éventualité de faux positifs dus à une contamination pendant la préparation du mélange réactionnel. Pour ce faire, on ajoute l'eau de qualité PCR exempte de ribonucléase qui a servi à préparer le mélange pour l'étape d'amplification.

**Témoin positif de l'extraction.** Ce témoin permet de vérifier que la qualité et la quantité de l'acide nucléique cible suffisent pour réaliser la RT-PCR et détecter le virus recherché. L'acide nucléique est extrait soit des tissus infectés d'un hôte, soit de tissus de plantes ou d'insectes sains inoculés avec CTV.

Pour la RT-PCR, il faut veiller à éviter toute contamination croisée due aux aérosols issus du témoin positif ou des échantillons positifs.

**Témoin négatif de l'extraction.** Ce témoin sert à contrôler la contamination pendant l'extraction de l'acide nucléique et/ou une réaction croisée avec le tissu hôte. Il est constitué d'acide nucléique extrait à partir de tissus sains de l'hôte puis amplifié. Il est recommandé d'employer plusieurs témoins quand on s'attend à ce qu'un grand nombre d'échantillons soient positifs.

### 3.6.7.1 RT-PCR classique et IC-RT-PCR

Une analyse RT-PCR ne sera considérée comme valide pour un pathogène spécifique que si les conditions suivantes sont satisfaites:

(1) le témoin positif produit un amplicon de la taille correcte, c'est-à-dire correspondant au virus;

(2) aucun amplicon qui soit de la taille correcte et qui corresponde au virus n'est produit avec le témoin négatif de l'extraction et le témoin négatif de l'amplification.

Si l'essai incorpore également les amorces visant l'ARN messager du gène mitochondrial *nad5* (directe: 5′-GAT GCT TCT TGG GGC TTC TTG TT-3′, inverse: 5′-CTC CAG TCA CCA ACA TTG GCA TAA-3′; produit de 181 pb) à titre de témoin interne, alors le témoin négatif de l'extraction constitué de tissu végétal sain (le cas échéant), le témoin positif et chaque échantillon d'essai doivent produire un amplicon de 115 pb. Si les amorces témoins internes n'amplifient pas les échantillons, cela peut indiquer par exemple que l'extraction de l'acide nucléique n'a pas fonctionné, que l'acide nucléique n'a pas été incorporé au mélange réactionnel, que l'extrait d'ARN contient des composés inhibant la RT-PCR ou que l'ARN est détérioré.

On estime qu'un échantillon est positif s'il produit un amplicon de la taille correcte.

### 3.6.7.2 RT-PCR en temps réel

Une analyse RT-PCR en temps réel ne sera considérée comme valide pour un pathogène donné que si les conditions suivantes sont satisfaites:

(1) le témoin positif donne une courbe d'amplification avec les amorces spécifiques au virus;

(2) le témoin négatif de l'extraction et le témoin négatif de l'amplification ne produisent pas de courbe d'amplification avec les amorces spécifiques au virus.

Le résultat est considéré comme positif pour un échantillon si ce dernier produit une courbe d'amplification comportant une phase exponentielle typique. La valeur du cycle seuil (Ct) doit être vérifiée dans chaque laboratoire lors de la première mise en œuvre de l'essai.

## 3.7 Validation dans le cadre d'une étude de la performance de l'essai

Il ressort d'un essai circulaire mené par dix laboratoires dans le cadre du projet DIAGPRO (Cambra *et al.*, 2002) portant sur dix échantillons codés, notamment des échantillons infectés par CTV et des tissus sains provenant de la collection de l'Instituto Valenciano de Investigaciones Agrarias (IVIA [Institut valencien de recherche agraire]), que l'exactitude du protocole associant culture directe sur empreinte de tissu et ELISA avec anticorps monoclonaux 3DF1 + 3CA5 atteint 99 pour cent (quotient nombre de diagnoses positives et négatives exactes / nombre d'échantillons analysés). Cette exactitude

est supérieure à celle des méthodes DAS-ELISA (98 pour cent), IC-RT-PCR (94 pour cent) et IC et RT-PCR nichée dans un tube clos unique (89 pour cent). La sensibilité de la culture directe sur empreinte de tissu - ELISA s'élève à 0,98, tandis que les autres techniques énumérées ci-dessous atteignent respectivement 0,96, 0,96 et 0,93 (Vidal *et al.*, 2012). La spécificité diagnostique de la culture directe sur empreinte de tissu - ELISA vaut 1,0 et s'établit à 1,0, 0,91 et 0,82 respectivement pour les autres méthodes énumérées ci-dessus. La valeur prédictive positive (VPP, soit les essais positifs qui sont effectivement infectés; Sackett *et al.*, 1991) de la culture directe sur empreinte de tissu - ELISA est égale à 1,0, tandis que les autres méthodes évoquées ont une VPP de 1,0, 0,94 et 0,89, respectivement. La valeur prédictive négative (VPN) (Sackett *et al.*, 1991) de la culture directe sur empreinte de tissu - ELISA vaut 0,97, et celle des autres méthodes est estimée à 0,95, 0,94 et 0,88, respectivement.

La culture directe sur empreinte de tissu - ELISA avec anticorps monoclonaux 3DF1 + 3CA52 est apparue comme le protocole le plus fiable, simple et économique pour la détection régulière de CTV dans le matériel végétal, par rapport à l'indexation biologique sur le limettier mexicain, l'essai ELISA, l'IC-RT-PCR et l'analyse IC et RT-PCR nichée (Cambra *et al.*, 2002). En outre, la culture directe sur empreinte de tissu - ELISA a été validée par Ruiz-García *et al.* (2005), lesquels ont analysé cette méthode et montré qu'elle était aussi sensible que le test DAS-ELISA (elle a détecté 97 pour cent des arbres positifs à partir de quatre pétioles) tout en étant plus facile à utiliser et meilleur marché. La culture directe sur empreinte de tissu - ELISA avec anticorps monoclonaux 3DF1 + 3CA52 a été comparée aux essais d'indexation sur limettier mexicain et de culture directe sur empreinte de tissu - RT-PCR pour la détection de CTV (Vidal *et al.*, 2012). L'évaluation des divers paramètres diagnostiques respectifs révèle que la culture directe sur empreinte de tissu - ELISA est la méthode la plus spécifique et la plus exacte, et offre de surcroît la meilleure probabilité de détection de la maladie après l'essai, quelle que soit la prévalence de CTV.

## 4. Identification des souches agressives de CTV

On peut identifier les souches de CTV au moyen d'analyses biologiques, sérologiques ou par amplification moléculaire.

Aucune méthode d'analyse de l'acide nucléique ne permet de caractériser les souches de CTV en fonction de leur agressivité avec fiabilité, car CTV est un phénotype. Les fondements génétiques de la forte variabilité biologique de ce virus demeurent largement inconnus (Moreno *et al.*, 2008). Le rôle biologique de sa diversité, en particulier les effets des recombinaisons, est également peu connu. En outre, le groupement des génotypes n'a pas été normalisé (Harper, 2013). Un large éventail de méthodes moléculaires ont été employées pour essayer de différencier les souches de CTV, dont les suivantes: hybridation moléculaire, profils de l'ARN bicaténaire, analyse des fragments de restriction de l'ADNc amplifié de CTV, PCR de diverses régions du génome, PCR en temps réel (Moreno *et al.*, 2008; Yokomi *et al.*, 2010), séquençage du génome et microréseaux de reséquençage. Les tentatives les plus récentes reposaient sur l'analyse de séquences de tests immunoenzymatiques ou sur des méthodes combinant électrophorèse capillaire et polymorphisme de conformation simple brin (Licciardello *et al.*, 2012). Toutefois, aucune de ces techniques ne s'est révélée pratique pour établir une catégorisation fiable des souches de CTV qui se disséminent naturellement. Du reste, ces méthodes restent au stade expérimental et ne sont pas encore validées.

Compte tenu de la variabilité génétique et biologique de CTV, les techniques qui ne reposent pas sur un séquençage peuvent dégager des résultats erronés s'agissant d'identifier les souches du virus. Le recours au séquençage haut débit, également appelé séquençage de nouvelle génération, pourrait rapidement livrer des informations sur la séquence génomique. Cela étant, on ne peut encore établir de lien entre la séquence nucléotidique de CTV et les propriétés biologiques et le comportement de la souche, c'est-à-dire son agressivité et sa transmissivité. Bien que certaines souches de CTV aient été classées et regroupées selon leur phénotype, leur virulence, leur gamme de plantes hôtes, la composition des épitopes et, plus récemment, la séquence propre à un ou plusieurs gènes (Moreno *et al.*, 2008), aucune corrélation nette n'a été établie avec le comportement biologique (Harper, 2013).

Voici les méthodes recommandées pour obtenir des informations sur les propriétés biologiques d'une souche donnée de CTV (Figure 2):

(1) Indexation biologique au moyen d'une gamme de plantes indicatrices comme *C. aurantifolia*, *C. macrophylla*, *C. sinensis* ou *C. paradisi* (cultivar Duncan), pour évaluer le bois strié, ou de jeunes plants de *C. aurantium* ou *C. limon*, pour évaluer la jaunisse (Roistacher, 1991; Ballester-Olmos *et al.*, 1993).

(2) Réactivité à l'égard de l'anticorps monoclonal MCA13 (Permar *et al.*, 1990), qui reconnaît un épitope bien conservé chez les souches sévères (agressives) de CTV mais absent des souches bénignes (moins agressives) (Pappu, *et al.*, 1993). Une réaction avec MCA13 est fortement corrélée à la capacité d'induire un dépérissement des arbres greffés sur des bigaradiers ou des citronniers. La majorité des souches de CTV qui provoquent des striures du bois chez le pamplemoussier ou l'oranger doux sont positives à MCA13.

## 4.1 Indexation biologique

La procédure d'indexation biologique des souches agressives de CTV est présentée à la section 3.3.

## 4.2 Analyses sérologiques avec MCA13

### 4.2.1 Culture directe sur empreinte de tissus - ELISA

Un kit complet contenant l'anticorps monoclonal spécifique à CTV MCA13 ainsi que des membranes portant déjà les empreintes des témoins positif et négatif, le substrat ainsi que l'ensemble des réactifs et tampons, est disponible auprès de Plant Print Diagnòstics SL[1]. La méthode est la suivante:

Presser les tissus sur les membranes et bloquer conformément aux instructions de la section 3.5.1. Préparer une solution de l'anticorps monoclonal spécifique à CTV MCA13 conjugué à la phosphatase alcaline (environ 0,1 µg/ml dans du PBS), recouvrir les membranes de cette solution et incuber pendant 3 h à température ambiante en agitant légèrement. Les procédures de lavage et de développement des membranes ainsi que la lecture et l'interprétation des résultats sont détaillées à la section 3.5.1. La présence de petits précipités caractéristiques pourpre-violet dans la région vasculaire du matériel végétal indique la présence d'une souche de CTV particulièrement agressive.

### 4.2.2 DAS-ELISA

Mettre en œuvre l'essai DAS-ELISA conçu par Garnsey et Cambra (1991) en suivant la méthode décrite ci-dessous. Un kit fondé sur l'anticorps monoclonal spécifique à CTV MCA13 est commercialisé par Plant Print Diagnòstics SL[1].

Réaliser l'étape de revêtement conformément aux instructions de la section 3.5.2. Ajouter une dilution appropriée de l'anticorps monoclonal spécifique à CTV MCA13 conjugué à la phosphatase alcaline (environ 0,1 µg/ml dans du PBS contenant 0,5 % de BSA). Les étapes d'incubation, de lavage, d'ajout du substrat ainsi que l'interprétation des résultats sont détaillées à la section 3.5.2.

## 5. Données à conserver

Les données et les éléments probants à consigner et à conserver sont énumérés à la section 2.5 de la NIMP 27 (*Protocoles de diagnostic pour les organismes nuisibles réglementés*).

Lorsque les résultats de la diagnose peuvent porter préjudice à d'autres parties contractantes, en particulier dans les cas de non-conformité et lorsque le virus est identifié pour la première fois dans une zone, le matériel supplémentaire suivant devrait être conservé, le cas échéant, d'une manière qui garantisse la traçabilité:

- L'échantillon original devrait être conservé à −80 °C ou lyophilisé et stocké à température ambiante.

- Les extraits d'ARN devraient être conservés à −80 °C. Les empreintes de sections de tissus et/ou les extraits végétaux déposés sur membranes en nylon ou sur papier devraient être conservés à température ambiante.
- Les produits de la RT-PCR devraient être conservés à −20 °C.

## 6. Points de contact pour tout complément d'informations

Des informations complémentaires sur le présent protocole peuvent être obtenues auprès des organismes suivants:

Centro de Protección Vegetal, Instituto Valenciano de Investigaciones Agrarias (IVIA), Carretera Moncada-Náquera km 4,5, 46113 Moncada (Valence), Espagne (Mariano Cambra; courriel: mcambra@ivia.es ou mcambra@mcambra.es).

Departamento de Fitossanidade, Faculdade de Agronomia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), Avenida Bento Gonçalves 7712, 91540-000 Porto Alegre, Brésil (Edson Bertolini; courriel: edson.bertolini@ufrgs.br; tél.: +55 (51) 3308 8100).

APHIS-USDA-PPQ-CPHST, 4700 River Road, Riverdale, MD 20737, États-Unis (Laurene Levy; courriel: laurene.levy@aphis.usda.gov; tél.: +1 301 851 2078; télécopie: +1 301 734 8724).

Citrus Research International (CRI), PO Box 28, 1200 Nelspruit, Mpumalanga, Afrique du Sud (S. P. Fanie van Vuuren; courriel: faniev@cri.co.za).

Alico, Inc., Suite 100, 10070 Daniels Interstate Court, Fort Myers, FL 33913, États-Unis (Marta Isabel Francis; courriel: mfrancis@alicoinc.com; tél.: +1 863 673 4774).

Les demandes de révision d'un protocole de diagnostic peuvent être présentées par des organisations nationales de la protection des végétaux (ONPV), des organisations régionales de la protection des végétaux (ORPV) ou des organes subsidiaires de la Commission des mesures phytosanitaires (CMP), par l'intermédiaire du Secrétariat de la CIPV (ippc@fao.org), qui la communique au Groupe technique sur les protocoles de diagnostic (GTPD).

## 7. Remerciements

La première version du présent protocole a été rédigée par M. Cambra (IVIA, Espagne (voir section précédente)), E. Bertolini (IVIA, Espagne (voir section précédente: actuellement joignable auprès de l'UFRGS)), L. Levy (APHIS-USDA, États-Unis (voir section précédente)); S. P. F. van Vuuren (CRI, Afrique du Sud (voir section précédente)) et M. I. Francis, Instituto Nacional de Investigación Agropecuaria (INIA) (Uruguay (voir section précédente: actuellement joignable auprès d'Alico, Inc.)).

La plupart des techniques décrites ont été évaluées par un essai circulaire réalisé dans le cadre du projet DIAGPRO financé par l'Union européenne ou de projets financés par l'Instituto Nacional de Investigación y Technología Agraria y Alimentaria (INIA) et le Ministère espagnol de l'agriculture, de l'alimentation et de l'environnement.

## 8. Références

La présente annexe fait référence aux normes internationales pour les ressources phytosanitaires (NIMP). Les NIMP sont consultables sur le Portail phytosanitaire international (PPI): https://www.ippc.int/fr/core-activities/standards-setting/ispms.

**Albertini, D., Vogel, R., Bové, C., et Bové, J. M.** 1988. Transmission and preliminary characterization of *Citrus tristeza virus* strain K. *In* L. W. Timmer, S. M. Garnsey et L. Navarro (sous la direction de). *Proceedings of the 10th Conference of the International Organization of Citrus Virologists (IOCV)*. pp. 17-21. Riverside, CA (États-Unis) (www.iocv.org/proceedings.html).

**Ballester-Olmos, J. F., Pina, J. A., Carbonell, E., Moreno, P., Hermoso de Mendoza, A., Cambra, M., et Navarro, L.** 1993. Biological diversity of *Citrus tristeza virus* (CTV) isolates in Spain. *Plant Pathology*, 42: 219-229.

**Bar-Joseph, M., Marcus, R., et Lee, R. F.** 1989. The continuous challenge of *Citrus tristeza virus* control. *Annual Review of Phytopathology*, 27: 291-316.

**Bertolini, E., Moreno, A., Capote, N., Olmos, A., De Luis, A., Vidal, E., Pérez-Panadés, J., et Cambra, M.** 2008. Quantitative detection of *Citrus tristeza virus* in plant tissues and single aphids by real-time RT-PCR. *European Journal of Plant Pathology*, 120: 177-188.

**Broadbent, P., Bevington, K. R., et Coote, B. G.** 1991. Control of stem pitting of grapefruit in Australia by mild strain protection. *In* R. H Brlansky, R. F. Lee et L. W. Timmer (sous la direction de). *Proceedings of the 11th Conference of the International Organization of Citrus Virologists (IOCV).* pp. 64-70. Riverside, CA (États-Unis) (www.iocv.org/proceedings.html).

**Cambra, M., Boscia, D., Gil, M., Bertolini, E., et Olmos, A.** 2011. Immunology and immunological assays applied to the detection, diagnosis and control of fruit tree viruses. *In* A. Hadidi, M. Barba, T. Candresse et W. Jelkmann (sous la direction de). *Virus and virus-like disease of pome and stone fruits*, pp. 303-313. St Paul, MN (États-Unis), APS Press. 429 pp.

**Cambra, M., Garnsey, S. M., Permar, T. A., Henderson, C. T., Gumph, D., et Vela, C.** 1990. Detection of *Citrus tristeza virus* (CTV) with a mixture of monoclonal antibodies. *Phytopathology*, 80: 103.

**Cambra, M., Gorris, M. T., Marroquín, C., Román, M. P., Olmos, A., Martinez, M. C., Hermoso de Mendoza, A., López, A., et Navarro, L**. 2000a. Incidence and epidemiology of *Citrus tristeza virus* in the Valencian Community of Spain. *Virus Research*, 71: 85-95.

**Cambra, M., Gorris, M. T., Román, M. P., Terrada, E., Garnsey, S. M., Camarasa, E., Olmos, A., et Colomer, M.** 2000b. Routine detection of *Citrus tristeza virus* by direct Immunoprinting-ELISA method using specific monoclonal and recombinant antibodies. *In* J. da Graça, R. F. Lee et R. K. Yokomi (sous la direction de). *Proceedings of the 14th Conference of the International Organization of Citrus Virologists (IOCV)*, pp. 34-41. Riverside, CA (États-Unis) (www.iocv.org/proceedings.html).

**Cambra, M., Gorris, M. T., Olmos, A., Martínez, M. C., Román, M. P., Bertolini, E., López, A., et Carbonell, E. A.** 2002. European Diagnostic Protocols (DIAGPRO) for *Citrus tristeza virus* in adult trees. *In* J. da Graça, R. Milne et L. W. Timmer (sous la direction de). *Proceedings of the 15th Conference of the International Organization of Citrus Virologists (IOCV).* pp. 69-77. Riverside, CA (États-Unis) (www.iocv.org/proceedings.html).

**Duran-Vila, N., et Moreno, P**. 2000. *Enfermedades de los cítricos.* Monografías de la Sociedad Española de Fitopatología (SEF) Nº 2. Madrid, Ediciones Mundi-Prensa Libros and SEF (www.sef.es). 165 pp.

**Garnsey, S. M., et Cambra, M.** 1991. Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) for citrus pathogens. *In* C. N. Roistacher (sous la direction de). *Graft-transmissible diseases of citrus: Handbook for detection and diagnosis*, pp. 193-216. Rome, FAO. 286 pp.

**Garnsey, S. M., et Lee, R. F**. 1988. Tristeza. *In* J. O. Whiteside, S. M. Garnsey et L. W. Timmer (sous la direction de). *Compendium of citrus diseases*, pp. 48-50. APS Press. St. Paul, MN (États-Unis). 80 pp.

**Garnsey, S. M., Permar, T. A., Cambra, M., et Henderson, C. T.** 1993. Direct tissue blot immunoassay (DTBIA) for detection of *Citrus tristeza virus* (CTV). *In* P. Moreno, J. da Graça et L.W. Timmer (sous la direction de). *Proceedings of the 12th Conference of the International Organization of Citrus Virologists (IOCV).* pp. 39-50. Riverside, CA (États-Unis) (www.iocv.org/proceedings.html).

**Gottwald, T. R., Garnsey, S. M., Cambra, M., Moreno, P., Irey, M., et Borbón, J.** 1997. Comparative effects of aphid vector species on increase and spread of *Citrus tristeza virus*. *Fruits*, 52: 397-404.

**Gottwald, T. R., Polek, M. L., et Riley, K.** 2002. History, present incidence, and spatial distribution of *Citrus tristeza virus* in the California Central Valley. *In* N. Duran-Vila, R. G. Milne et J.V. da Graça (sous la direction de). *Proceedings of the 15th Conference of the International Organization of Citrus Virologists (IOCV).* pp. 83-94. Riverside, CA (États-Unis) (www.iocv.org/proceedings.html).

**da Graça, J. V., et van Vuuren, S. P.** 2010. Managing *Citrus tristeza virus* losses using cross protection. *In* A. V. Karasev et M. E. Hilf (sous la direction de). Citrus tristeza virus *complex and tristeza diseases*, pp. 247-260. Eagan, MN (États-Unis), APS Press. 304 pp.

**Harju, V. A., Henry, C. M., Cambra, M., Janse, J., et Jeffries, C.** 2000. Protocoles de diagnostic pour des organismes nuisibles aux végétaux-DIAGPRO. *Bulletin OEPP/EPPO*, 30: 365-366.

**Harper, S. J.** 2013. *Citrus tristeza virus*: Evolution of complex and varied genotypic groups. *Frontiers in Microbiology*, doi:10.3389/fmicb.2013.00093.

**Harper, S. J., Dawson, T. E., et Pearson, M. N.** 2008. Molecular analysis of the coat protein and minor coat protein genes of New Zealand *Citrus tristeza virus* isolates that overcome the resistance of *Poncirus trifoliata* (L.) Raf. *Australian Plant Pathology*, 37: 379-386.

**Ilharco, F. A., Sousa-Silva, C. R., et Alvarez-Alvarez, A.** 2005. First report on *Toxoptera citricidus* (Kirkaldy) in Spain and continental Portugal. *Agronomia Lusitana*, 51: 19-21.

**Licciardello, G., Raspagliesi, D., Bar-Joseph, M., et Catara, A.** 2012. Characterization of isolates of *Citrus tristeza virus* by sequential analyses of enzyme immunoassays and capillary electrophoresis-single-strand conformation polymorphisms. *Journal of Virological Methods*, 181: 139-147.

**Maroquins, C., Olmos, A., Gorris, M. T., Bertolini, E., Martínez, M. C., Carbonell, E. A., Hermoso de Mendoza, A. H., et Cambra, M.** 2004. Estimation of the number of aphids carrying *Citrus tristeza virus* that visit adult citrus trees. *Virus Research*, 100: 101-108.

**Moreno, P., Ambros, S., Albiach-Martí, M. R., Guerri, J., et Peña, L.** 2008. *Citrus tristeza virus*: A pathogen that changed the course of the citrus industry. *Molecular Plant Pathology*, doi:10.1111/J.1364-3703.2007.00455.X.

**Nikolaeva, O. V., Karasev, A. V., Powell, C. A., Gumpf, D. J., Garnsey, S. M., et Lee, R. F.** 1996. Mapping of epitopes for *Citrus tristeza virus*-specific monoclonal antibodies using bacterially expressed coat protein fragments. *Phytopathology*, 86: 974-979.

**Olmos, A., Cambra, M., Esteban, O., Gorris, M. T., et Terrada, E**. 1999. New device and method for capture, reverse transcription and nested PCR in a single closed tube. *Nucleic Acids Research*, 27: 1564-1565.

**Pappu, H. R., Manjunath, K. L., Lee, R. F., et Niblett, C. L.** 1993. Molecular characterization of a structural epitope that is largely conserved among severe isolates of a plant virus. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 90: 3641-3644.

**Permar, T. A., Garnsey, S. M., Gumpf, D. J., et Lee, R.** 1990. A monoclonal antibody that discriminates strains of *Citrus tristeza virus*. *Phytopathology*, 80: 224-228.

**Roistacher, C. N.** 1991. *Graft-transmissible diseases of citrus: Handbook for detection and diagnosis.* Rome, FAO. 286 pp.

**Román, M. P., Cambra, M., Júarez, J., Moreno, P., Durán-Vila, N., Tanaka, F. A. O., Álves, E., Kitajima, E. W., Yamamoto, P. T., Bassanezi, R. B., Teixeira, D. C., Jesús Jr, W. C., Ayres, J. A., Gimenes-Fernandes, N., Rabenstein, F., Girotto, L. F., et Bové, J. M.** 2004. Sudden death of citrus in Brazil: A graft transmissible, bud union disease. *Plant Disease*, 88: 453-467.

**Ruiz-García, N., Mora-Aguilera, G., Rivas-Valencia, P., Ochoa-Martínez, D., Góngora-Canul, C., Loeza-Kuk, E. M., Gutíerrez-E, A., Ramírez-Valverde, G., et Álvarez-Ramos, R.** 2005. Probability model of *Citrus tristeza virus* detection in the tree canopy and reliability and efficiency of direct immunoprinting-ELISA. *In* M. E. Hilf, N. Duran-Vila et M. A. Rocha-Peña (sous la direction de). *Proceedings of the 16th Conference of the International Organization of*

*Citrus Virologists (IOCV).* pp. 196-204. Riverside, CA (États-Unis) (www.iocv.org/proceedings.html).

**Sackett, D. L., Haynes, R. B., Guyatt, G. H., et Tugwell, P.** 1991. *Clinical epidemiology: A basic science for clinical medicine,* 2e éd. Boston, MA (États-Unis), Little Brown and Co. 441 pp.

**Saponari, M., Manjunath, K., et Yokomi, R. K.** 2008. Quantitative detection of *Citrus tristeza virus* in citrus and aphids by real-time reverse transcription-PCR (TaqMan). *Journal of Virological Methods*, 147: 43-53.

**Terrada, E., Kerschbaumer, R. J., Giunta, G., Galeffi, P., Himmler, G., et Cambra, M.** 2000. Fully "Recombinant enzyme-linked immunosorbent assays" using genetically engineered single-chain antibody fusion proteins for detection of *Citrus tristeza virus*. *Phytopathology*, 90: 1337-1344.

**Timmer, L. W., Garnsey, S. M., et Graham, J. H.** 2000. *Compendium of citrus diseases.* St Paul, MN (États-Unis), APS Press. 92 pp.

**Vela, C., Cambra, M., Cortés, E., Moreno, P., Miguet, J., Pérez de San Román, C., et Sanz, A.** 1986. Production and characterization of monoclonal antibodies specific for *Citrus tristeza virus* and their use for diagnosis. *Journal of General Virology*, 67: 91-96.

**Vidal, E., Yokomi, R. K., Moreno, A., Bertolini, E., et Cambra, M.** 2012. Calculation of diagnostic parameters of advanced serological and molecular tissue-print methods for detection of *Citrus tristeza virus*. A model for other plant pathogens. *Phytopathology*, 102: 611-619.

**Yokomi, R. K., Garnsey, S. M., Civerolo, E. L., et Gumpf, D.** 1989. Transmission of exotic citrus tristeza isolates by a Florida colony of *Aphis gossypii*. *Plant Disease*, 73: 552-556.

**Yokomi, R. K., Saponari, M., et Sieburth, P. J.** 2010. Rapid differentiation and identification of potential severe strains of *Citrus tristeza virus* by real-time reverse transcription-polymerase chain reaction assays. *Phytopathology*, 100: 319-327.

**Zebzami, M., Garnsey, S. M., Nadori, E. B., et Hill, J. H.** 1999. Biological and serological characterization of *Citrus tristeza virus* (CTV) isolates from Morocco. *Phytopathologia Mediterranea*, 38: 95-100.

## 9. Figures

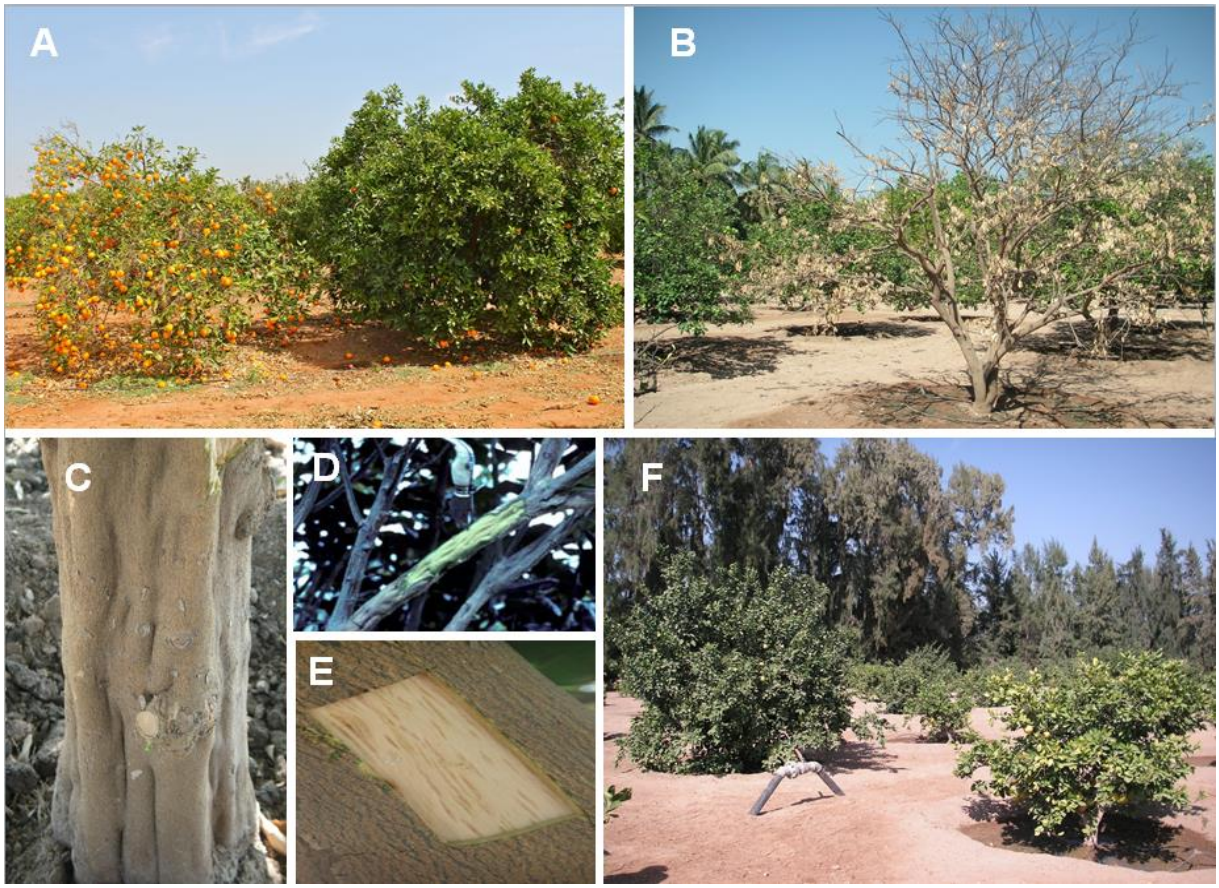


**Figure 1.** Symptômes d'une infection par *Citrus tristeza virus* (CTV): (A) syndrome de la tristeza ou dépérissement des orangers doux greffés sur des bigaradiers infectés par CTV (gauche) et arbres asymptomatiques (droite); (B) ratatinement ou dépérissement rapide d'un pamplemoussier greffé sur un bigaradier; (C) bois strié sur le tronc d'un pamplemoussier greffé sur un citranger Troyer causé par une souche agressive de CTV; (D) cas sévère de bois strié sur les branches d'un pamplemoussier; (E) bois strié sur le tronc d'un oranger doux greffé sur un mandarinier Cleopatra; et (F) rabougrissement marqué d'orangers doux infectés par CTV greffés sur un citranger Carrizo (droite), par rapport à un arbre sain (gauche).
*Photos publiées avec l'aimable autorisation de (A) P. Moreno; (B, C, E) M. Cambra; (D) L. Navarro; (F) M. Cambra et J. A. Pina. Toutes les photos proviennent de l'Instituto Valenciano de Investigaciones Agrarias (IVIA) à Moncada (Espagne).*

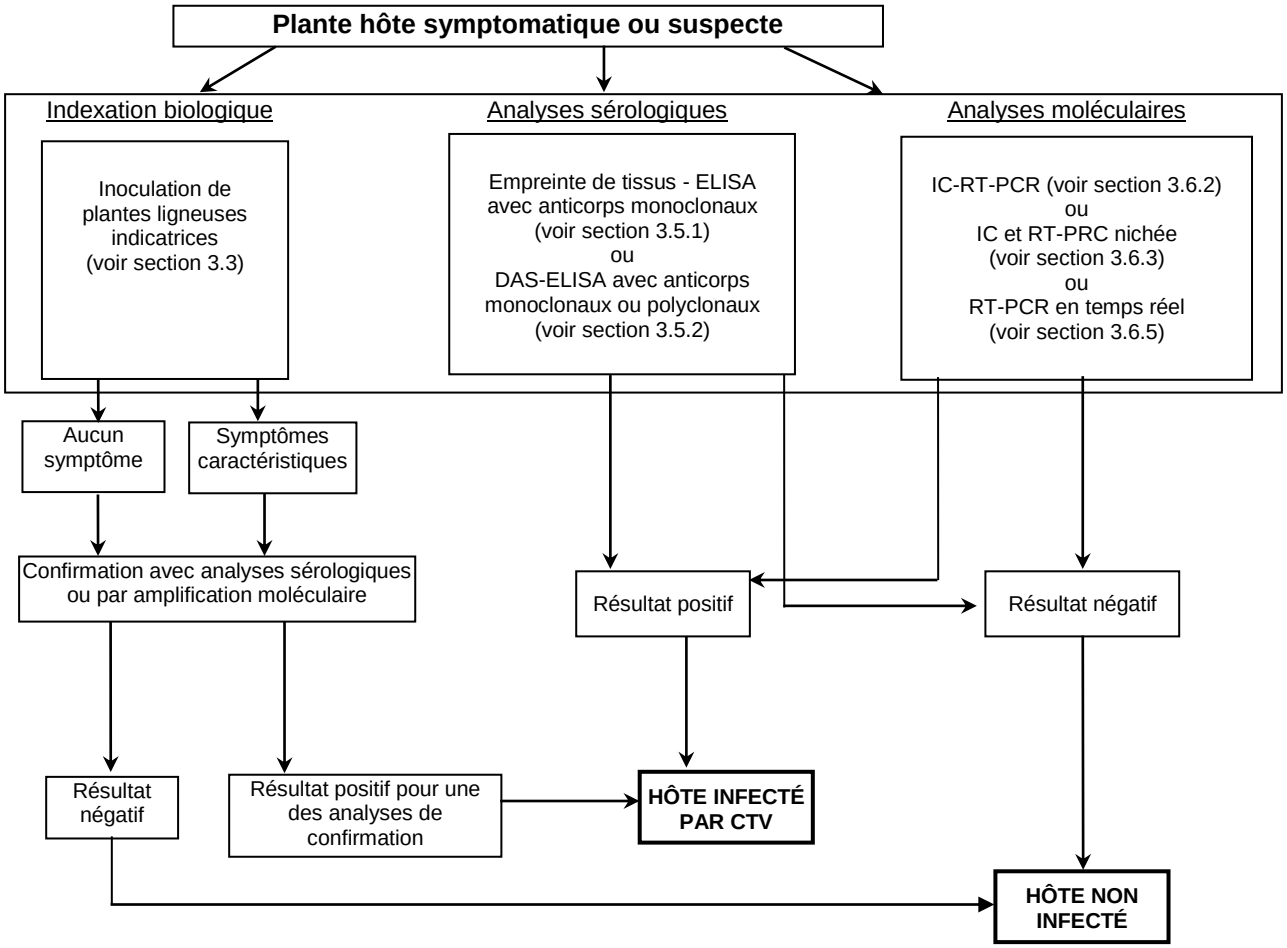


**Figure 2.** Diagramme de détection et identification de *Citrus tristeza virus* (CTV).
DAS: méthode ELISA sandwich; ELISA: essai d'immuno-absorption enzymatique; IC: immunocapture; PCR: réaction de polymérisation en chaîne; RT: transcription inverse.

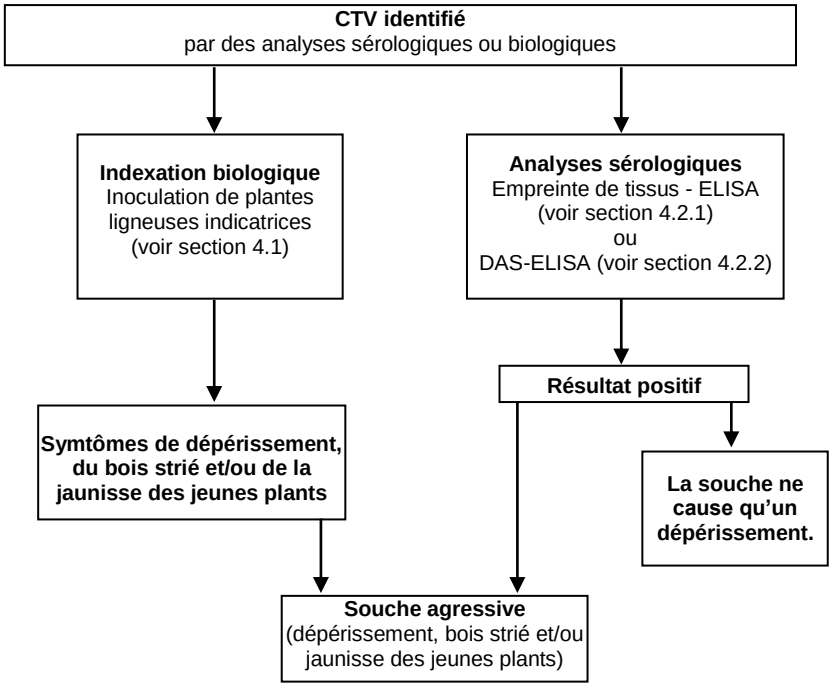


**Figure 3.** Diagramme d'identification des souches agressives de *Citrus tristeza virus* (CTV). DAS: méthode ELISA sandwich; ELISA: essai d'immuno- absorption enzymatique.

**Étapes de la publication**

*Ce récapitulatif ne fait pas officiellement partie de la norme.*

2004-11 Le Comité des normes (CN) ajoute le sujet original: *Citrus tristeza virus* (2004-021).

2006-04 À sa première session, la Commission des mesures phytosanitaires (CMP) ajoute le sujet au programme de travail dans le thème: Virus et phytoplasmes (2006-009).

2006-04 À sa première session (2006), la CMP ajoute le thème au programme de travail: Nématodes (2006-008).

2014-04 Consultation d'experts.

201-01 Le CN approuve le texte en vue de la consultation des membres (2015_eSC_May_02).

2015-02 Consultation des membres.

2015-12 Le groupe de rédaction examine le projet de PD et répond aux commentaires des membres.

2015-11 Le texte est communiqué au CN pour approbation de la période de notification des protocoles de diagnostic

(2016_eTPDP_Feb_02).

2016-03 Par décision électronique, le CN approuve la transmission dans les 45 jours de la période de notification du PD (2016_eSC_May_10).

2016-08 Le CN adopte le PD au nom de la CMP (aucune objection soulevée).

**NIMP 27. Annexe 15.** *Citrus tristeza virus* (2016). Rome, CIPV, FAO.

2019-01 Le Secrétariat de la CIPV a corrigé une erreur dans la section 3.6.5 et dans la Figure 2.

Dernière mise à jour des étapes de la publication: 2019-01.

## CIPV

La Convention Internationale pour la Protection des Végétaux (CIPV) est un accord international sur la santé des végétaux qui vise à protéger les plantes cultivées et sauvages en prévenant l'introduction et la dissémination d'organismes nuisibles. Les voyages et les échanges internationaux n'ont jamais été aussi développés qu'aujourd'hui. Cette circulation des personnes et des biens à travers le monde s'accompagne d'une dissémination des organismes nuisibles qui constituent une menace pour les végétaux.

**Organization**

- La CIPV compte plus de 180 parties contractantes.
- Chaque partie contractante est rattachée à une Organisation nationale de la protection des végétaux (ONPV) et dispose d'un Point de contact officiel de la CIPV.
- Neuf organisations régionales de la protection des végétaux (ORPV) agissent pour faciliter la mise en œuvre de la CIPV dans les pays.
- La CIPV assure la liaison avec les organisations internationales compétentes pour aider au renforcement des capacités régionales et nationales.
- Le Secrétariat est fourni par l'Organisation des Nations Unies pour l'alimentation et l'agriculture (FAO).

**Convention Internationale pour la Protection des Végétaux (CIPV)**

Viale delle Terme di Caracalla, 00153 Rome (Italie)
Tél: +39 06 5705 4812
Courriel: ippc@fao.org | Site Internet: www.ippc.int