



NIMP 27
Annexe X

NORMES INTERNATIONALES POUR LES MESURES PHYTOSANITAIRES

NIMP 27 PROTOCOLES DE DIAGNOSTIC

PROJET DE PDD X: *Plum pox virus*

(201-)

DRAFT
DOCUMENT

Informations relatives à la publication

Date du présent document	2 novembre 2011
Catégorie de document	Projet de nouvelle annexe de la NIMP 27:2006 (<i>Protocoles de diagnostic pour les organismes nuisibles réglementés</i>)
État d'avancement du document	Projet de texte pour la septième session de la CMP, 2012 Décision électronique du CN: octobre 2011
Origine	Thème du programme de travail: Virus et phytoplasmes, première session de la CMP (2006) (2004-007)
Principales étapes	Approbation du texte à soumettre aux membres pour consultation: mai 2010 Consultation des membres: juin 2010 Décision électronique du CN: octobre 2011
Notes	Modèle de fichier: IPPCStyles, octobre 2011. Numérotation automatique en marge.

TABLE DES MATIÈRES

1. Informations sur l'organisme nuisible.....	5
2. Données taxonomiques.....	5
3. Détection et identification	5
3.1 Détection biologique.....	7
3.2 Détection et identification sérologiques	7
3.2.1 Analyse par dosage immunoenzymatique indirect utilisant deux antisérums spécifiques (DASI-ELISA)	8
3.2.2 Analyse par dosage immunoenzymatique utilisant deux antisérums spécifiques (DAS-ELISA)	8
3.3 Détection et identification moléculaires	8
3.3.1 Transcription inverse suivie d'une réaction d'amplification génique (RT-PCR)	9
3.3.2 Immunocapture - transcription inverse suivie d'une réaction d'amplification génique (IC-RT-PCR)	9
3.3.3 Méthode coopérationnelle transcription inverse suivie d'une réaction d'amplification génique (Co-RT-PCR)	10
3.3.4 Transcription inverse suivie d'une réaction d'amplification génique en temps réel (RT-PCR en temps réel).....	11
4.1 Identification sérologique des souches	13
4.2 Identification moléculaire des souches	14
4.2.1 Transcription inverse suivie d'une réaction d'amplification génique.....	14
4.2.2 Immunocapture - transcription inverse suivie d'une réaction d'amplification génique	14
4.2.3 Méthode coopérationnelle transcription inverse suivie d'une réaction d'amplification génique	14
4.2.4 Transcription inverse suivie d'une réaction d'amplification génique en temps réel	15
5. Données à enregistrer	16
6. Points de contact pour tout complément d'information	16
7. Auteurs et collaborateurs.....	17
8. Références	17

[1] 1. Informations sur l'organisme nuisible

[2] La sharka est l'une des maladies les plus graves des fruits à noyaux. Cette maladie, causée par *Plum pox virus* (PPV) concerne les espèces du genre *Prunus*. Elle est particulièrement nuisible à *P. armeniaca*, *P. domestica*, *P. persica* et *P. salicina* parce qu'elle nuit à la qualité des fruits et entraîne leur chute prématurée. On estime que les coûts de la lutte raisonnée contre la sharka dans le monde depuis les années 70 sont supérieurs à 10 milliards d'EUR (Cambra *et al.*, 2006b).

[3] La sharka a été signalée pour la première fois dans *P. domestica* en Bulgarie en 1917-1918 et décrite comme maladie virale en 1932. Depuis lors, le virus s'est disséminé progressivement dans une grande partie de l'Europe, sur les pourtours du bassin méditerranéen, au Proche-Orient et au Moyen-Orient. Sa présence a été observée dans une aire de répartition restreinte, en Amérique du Nord, en Amérique du Sud et en Asie (OEPP, 2006; CAB International, 2011).

[4] Le PPV appartient au genre *Potyvirus*, de la famille des *Potyviridae*. Les particules virales se présentent sous la forme de filaments sinueux d'environ 700 nm × 11 nm et sont composées d'une molécule d'ARN à un seul brin constituée de près de 10 000 nucléotides recouverts par un maximum de 2000 sous-unités d'une protéine d'enveloppe unique (García et Cambra, 2007). Dans les vergers, le PPV est transmis par des pucerons d'une manière non persistante mais c'est principalement à l'occasion du déplacement de matériel végétal de multiplication infecté qu'il se dissémine sur de grandes distances.

[5] Les isolats du PPV sont actuellement classés en sept types ou souches: D (Dideron), M (Marcus), C (Cherry), EA (El Amar), W (Winona), Rec (Recombinant) et T (Turkish) (Candresse et Cambra, 2006; James et Glasa, 2006; Ulubaş Serçe *et al.*, 2009). La plupart des isolats du PPV appartiennent aux types D et M. Les souches D et M du PPV peuvent aisément infecter *P. armeniaca* et *P. domestica* mais n'ont pas la même capacité d'infection sur les cultivars de *P. persica*. Le pouvoir pathogène varie selon les souches; ainsi, les isolats M provoquent généralement, chez les espèces *P. armeniaca*, *P. domestica*, *P. persica* et *P. salicina*, des épidémies plus rapides et des symptômes plus graves que les isolats D. Les isolats EA sont géographiquement limités à l'Égypte et on ne dispose pas de beaucoup de données sur leur épidémiologie et leurs propriétés biologiques. Des isolats du PPV infectant *P. avium* et *P. cerasus* ont été récemment identifiés dans plusieurs pays européens. Ces isolats forment un type distinct: le PPV-C. Un PPV atypique a été isolé dans *P. domestica* au Canada. Il s'agit du PPV-W, qui représente un type distinct de PPV. En outre, les recombinants naturels entre les types D et M de PPV ont été décrits comme étant des PPV-Rec présentant un comportement épidémiologique analogue au type D. Récemment, un deuxième type d'isolat recombinant a été identifié en Turquie (type T).

[6] On trouvera de plus amples informations sur le PPV, et notamment des illustrations des symptômes de la maladie, dans Barba *et al.* (2011), CAB International (2011), OEPP (2004), OEPP (2006), García et Cambra (2007) et PaDIL (2011).

[7] 2. Données taxonomiques

- **Nom:** *Plum pox virus* (abréviation PPV)
- **Synonyme:** Virus de la sharka
- **Position taxonomique:** *Potyviridae*, *Potyvirus*
- **Nom commun:** Sharka

[8] 3. Détection et identification

[9] Dans des conditions naturelles, le PPV infecte directement les arbres fruitiers du genre *Prunus* utilisés comme variétés commerciales ou porte-greffes: *P. armeniaca*, *P. cerasifera*, *P. davidiana*, *P. domestica*, *P. mahaleb*, *P. marianna*, *P. mume*, *P. persica*, *P. salicina*, et les hybrides issus de croisements entre ces espèces. *Prunus avium*, *P. cerasus* et *P. dulcis* peuvent être infectés occasionnellement. Le virus infecte aussi de nombreuses espèces de *Prunus* sauvages et ornementales comme *P. besseyi*, *P. cistena*, *P. glandulosa*, *P. insititia*, *P. laurocerasus*, *P. spinosa*, *P. tomentosa* et

P. triloba. Dans des conditions expérimentales, le PPV peut être transmis mécaniquement à de nombreuses espèces de *Prunus* et à plusieurs plantes herbacées (*Arabidopsis thaliana*, *Chenopodium foetidum*, *Nicotiana benthamiana*, *N. glutinosa*, *N. clevelandii* et *Pisum sativum*).

- [10] Les symptômes du PPV peuvent apparaître sur les feuilles, les pousses, l'écorce, les pétales, les fruits et les noyaux dans les vergers. Ils sont généralement bien visibles sur les feuilles au début de la période de végétation et présentent une légère décoloration vert pâle, des taches, des bandes ou des anneaux chlorotiques, une décoloration ou un jaunissement des nervures, ou encore une déformation des feuilles. Certains des symptômes visibles sur les feuilles sont analogues à ceux causés par d'autres virus, comme *American plum line pattern virus*, qui est responsable de la marbrure zonale du prunier. L'écorce de *Prunus cerasifera*, cultivar GF 31, présente un aspect liégeux brun-roux et un craquellement. Les symptômes floraux peuvent apparaître sur les pétales (décoloration) de certaines espèces de cultivars de *P. persica* infectés par le PPV-M ou de *P. glandulosa* infecté par le PPV-D. Les fruits infectés présentent des taches chlorotiques ou des anneaux jaunes légèrement pigmentés ou encore des marbrures. Les fruits peuvent être déformés ou d'aspect irrégulier et développer des zones nécrotiques ou brunes sous les anneaux décolorés. Certaines déformations des fruits, en particulier en ce qui concerne *P. armeniaca* et *P. domestica*, sont analogues à celles que provoque *Apple chlorotic leaf spot virus* (virus des taches chlorotiques du pommier). Les fruits atteints peuvent être bruns à l'intérieur, exsuder de la gomme, ce qui diminue leur qualité. Dans les cas les plus graves, ils tombent prématurément de l'arbre. En général, les fruits des cultivars hâtifs présentent des symptômes plus marqués que ceux des cultivars plus tardifs. Les noyaux des fruits malades de *P. armeniaca* présentent des anneaux ou des taches de décoloration typiques. L'alcool ou les spiritueux produits à partir des fruits malades ne sont pas commercialisables en raison de leur saveur désagréable. L'apparition et l'intensité des symptômes dépendent en grande partie de la plante hôte et des conditions climatiques; par exemple, en climat froid, le virus peut rester à l'état latent pendant plusieurs années.
- [11] On trouvera dans la NIMP 31:2008 (*Méthodes d'échantillonnage des envois*) des indications générales sur les méthodes d'échantillonnage. Le soin apporté à la sélection des échantillons est crucial pour détecter le PPV. L'échantillonnage devrait tenir compte de la biologie des virus et des conditions climatiques locales, et en particulier des conditions météorologiques pendant la période de végétation. Si les symptômes classiques sont présents, procéder à des prélèvements de fleurs, de feuilles ou de fruits attaqués. Lorsque les arbres sont asymptomatiques, des échantillons devraient être prélevés sur des pousses d'au moins un an ayant des feuilles à maturité ou des feuilles entièrement dépliées prélevées au milieu de chacune des branches maîtresses (les pousses de moins d'un an ne permettent pas une détection fiable). Les échantillons devraient être prélevés en quatre endroits différents au moins (c'est-à-dire quatre branches ou quatre feuilles) sur chaque arbre; cela est indispensable en raison de la répartition irrégulière du PPV. On ne devrait pas procéder à l'échantillonnage pendant les mois les plus chauds. Les analyses conduites sur des échantillons prélevés en automne sont moins fiables que celles qui sont menées sur des échantillons prélevés au printemps. Le matériel végétal devrait être de préférence prélevé à l'intérieur de la cime de l'arbre. Au printemps, les échantillons peuvent être des fleurs, des pousses avec des feuilles entièrement dépliées ou des fruits. En été et en automne, les feuilles à maturité et la peau des fruits mûrs prélevés sur l'arbre ou à la station fruitière peuvent être utilisées pour l'analyse. Les fleurs, les feuilles, les pousses et la peau du fruit peuvent être entreposées à 4 °C pendant une durée n'excédant pas 10 jours avant l'analyse. Les fruits peuvent être entreposés pendant un mois avant l'analyse. En hiver, les bourgeons dormants ou les tissus d'écorce de la partie basale des ramilles, des pousses, des branches ou des dards complets peuvent être sélectionnés.
- [12] Le PPV peut être détecté et identifié par des analyses biologiques, sérologiques ou moléculaires; l'identification s'effectue par analyse soit sérologique, soit moléculaire. On procède au minimum à une analyse soit sérologique, soit moléculaire pour détecter et identifier le PPV (par exemple pendant un diagnostic de routine d'un organisme nuisible largement établi dans un pays). Dans les cas où l'organisation nationale de la protection des végétaux (ONPV) exige un niveau de confiance supplémentaire pour l'identification du PPV (par exemple la détection dans une zone où la présence du virus n'a pas été signalée ou pour la détection d'un envoi provenant d'un pays où l'organisme

nuisible est déclaré absent), d'autres analyses peuvent être conduites. Lorsque l'identification initiale a été faite en utilisant une méthode moléculaire, ces autres analyses devraient utiliser des techniques sérologiques et vice versa. D'autres analyses peuvent aussi être conduites pour identifier la souche de PPV présente. Dans tous les cas, des témoins positifs et négatifs doivent être inclus dans les analyses. Les techniques recommandées sont décrites dans les sections suivantes.

[13] Dans certaines circonstances (par exemple pendant une diagnose de routine d'un organisme nuisible largement établi dans un pays), on peut conduire une analyse simultanément sur plusieurs arbres en utilisant comme échantillon un mélange de prélèvements issus de plusieurs arbres. La décision concernant la conduite d'une analyse sur un ou plusieurs arbres dépend de la concentration du virus dans les arbres et du niveau de confiance exigé par l'ONPV.

[14] 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 le degré de sensibilité, la spécificité et/ou la reproductibilité initialement obtenus. Les procédures de laboratoire présentées dans les protocoles peuvent être adaptées aux exigences des divers laboratoires, sous réserve qu'elles soient validées de façon adéquate.

[15] 3.1 Détection biologique

[16] Les principaux végétaux indicateurs utilisés pour l'indexation du PPV sont de jeunes plants de *P. cerasifera*, cultivar GF31, de *P. persica*, cultivar GF305, de *P. persica* × *P. davidiana*, cultivar Nema-guard, ou de *P. tomentosa*. Les végétaux indicateurs sont issus de semences cultivées dans des terreaux bien drainés et maintenus dans une serre protégée contre les insectes à une température de 18 °C à 25 °C jusqu'à ce qu'ils soient suffisamment grands pour être greffés (leur hauteur est généralement de 25 à 30 cm et leur diamètre de 3 à 4 mm. Il est également possible de greffer des greffons des végétaux indicateurs sur un jeune plant d'autres espèces de *Prunus*. Les indicateurs doivent être inoculés par greffage selon des méthodes classiques comme l'écussonnage (Desvignes, 1999), en utilisant quatre greffages parallèles par végétal indicateur. Les végétaux indicateurs sont conservés dans les mêmes conditions. Trois semaines plus tard, ils sont taillés à quelques centimètres au-dessus de la greffe supérieure (Gentit, 2006). Les arbres greffés devraient être inspectés pendant 6 semaines au moins pour la recherche des symptômes. Les symptômes, notamment les étranglements et les marbrures chlorotiques, sont observés au bout de trois à quatre semaines sur les parties nouvellement poussées et doivent être comparés à des témoins sains et positifs. On trouvera dans Damsteegt *et al.* (1997; 2007) et Gentit (2006) des illustrations des symptômes des végétaux indicateurs provoqués par le PPV.

[17] Il n'y a pas de données quantitatives publiées sur la spécificité, la sensibilité ou la fiabilité du greffage. La méthode, utilisée couramment dans les programmes de certification, est considérée comme une méthode de détection sensible. Cependant, elle n'est pas rapide (l'apparition des symptômes se produit plusieurs semaines après l'inoculation), elle ne peut être utilisée que pour du bois de greffe et nécessite des installations adaptées, notamment un espace sous serre à température régulée. Par ailleurs, les symptômes observés peuvent être confondus avec ceux d'autres agents transmissibles par greffage. De surcroît, il y a des souches qui ne provoquent pas de symptômes et qui ne sont donc pas détectables sur des végétaux indicateurs.

[18] 3.2 Détection et identification sérologiques

[19] Les analyses par dosage immunoenzymatique (ELISA) sont particulièrement recommandées pour l'examen de grandes quantités d'échantillons.

[20] Pour traiter les échantillons, on coupe en petits morceaux environ 0,2 à 0,5 g de matériel végétal frais, que l'on place dans un tube ou un sachet en plastique approprié. On ajoute environ 4 à 10 ml (1:20 p/v) de tampon d'extraction et on homogénéise l'échantillon à l'aide d'un homogénéiseur électrique, d'un rouleau ou d'un marteau manuel ou de tout autre outil analogue. Le tampon d'extraction est composé d'un tampon phosphate salin (PBS) dont le pH est de 7,2 à 7,4 et qui contient 2 pour cent de

polyvinylpyrrolidone et 0,2 pour cent de sodium diéthylthiocarbamate (Cambra *et al.*, 1994) ou d'un autre tampon correctement validé. Le matériel végétal devrait être frais et homogénéisé avec soin.

[21] 3.2.1 Analyse par dosage immunoenzymatique indirect utilisant deux antisérums spécifiques (DASI-ELISA)

[22] La méthode DASI-ELISA, également appelée ELISA sandwich à trois antisérums (TAS)-ELISA, devrait être appliquée selon Cambra *et al.* (1994) en utilisant un antisérum monoclonal spécifique tel que 5B-IVIA conformément aux instructions du fabricant.

[23] L'antisérum 5B-IVIA est actuellement le seul antisérum monoclonal dont il a été démontré qu'il était capable de détecter toutes les souches de PPV avec une fiabilité, une spécificité et une sensibilité élevées (Cambra *et al.*, 2006a). Dans un essai comparatif DIAGPRO effectué par dix-sept laboratoires utilisant un groupe de dix échantillons infectés par le PPV (PPV-D, PPV-M et PPV-D + M) et sains provenant de France et d'Espagne, la précision de l'analyse DASI-ELISA utilisant l'antisérum monoclonal 5B-IVIA était de 95 pour cent (nombre de vrais négatifs et de vrais positifs diagnostiqués par rapport au nombre d'échantillons analysés). Cette précision était supérieure à celle obtenue par la méthode d'immunocapture-transcription inverse suivie d'une réaction d'amplification génique (IC-RT-PCR), dont la précision était de 82 pour cent ou par la méthode coopérative transcription inverse suivie d'une réaction d'amplification génique (Co-RT-PCR), dont la précision était de 94 pour cent (Cambra *et al.*, 2006c; Olmos *et al.*, 2007). La proportion de vrais négatifs (nombre de vrais négatifs diagnostiqués par rapport au nombre de végétaux sains) identifiée par la méthode DASI-ELISA en utilisant l'antisérum monoclonal 5B-IVIA était de 99,0 pour cent comparée à la méthode RT-PCR en temps réel utilisant un acide nucléique purifié (89,2 pour cent) ou des échantillons issus de végétaux présentant des taches (98,0 pour cent), ou à la méthode IC-RT-PCR (96,1 pour cent). Capote *et al.* (2008) ont aussi montré qu'il existe une probabilité égale à 98,8 pour cent qu'un résultat positif obtenu en hiver avec la méthode DASI-ELISA utilisant l'antisérum monoclonal 5B-IVIA soit un vrai positif.

[24] 3.2.2 Analyse par dosage immunoenzymatique utilisant deux antisérums spécifiques (DAS-ELISA)

[25] La méthode classique ou système biotine/streptavidine de DAS-ELISA sandwich à deux antisérums devrait comporter l'emploi de kits fondés sur l'utilisation spécifique de l'antisérum monoclonal 5B-IVIA ou sur des antisérums polyclonaux qui ont la capacité démontrée de détecter toutes les souches de PPV sans réactions croisées avec d'autres virus ou du matériel végétal sain (Cambra *et al.*, 2006a; Capote *et al.*, 2009). L'analyse devrait être conduite conformément aux instructions du fabricant.

[26] L'antisérum monoclonal 5B-IVIA détecte toutes les souches de PPV de manière spécifique, sensible et fiable. Certains antisérums polyclonaux, quant à eux, ne sont pas spécifiques et ont une sensibilité limitée (Cambra *et al.*, 1994; Cambra *et al.*, 2006a). En conséquence, l'utilisation d'autres méthodes est recommandée lorsque les antisérums polyclonaux ont été utilisés pour une analyse et que l'ONPV exige un niveau de confiance plus élevé pour l'identification du PPV.

[27] 3.3 Détection et identification moléculaires

[28] Les méthodes moléculaires de transcription inverse suivie d'une réaction d'amplification génique (RT-PCR) peuvent être plus coûteuses et/ou prendre davantage de temps que les techniques sérologiques, notamment pour des analyses à grande échelle. Cependant, les méthodes moléculaires, en particulier la méthode RT-PCR en temps réel, sont généralement plus sensibles que les techniques sérologiques. L'utilisation de la méthode RT-PCR en temps réel évite par ailleurs d'avoir recours à un quelconque traitement post-amplification (par exemple l'électrophorèse sur gel). Elle est donc plus rapide et laisse moins de possibilités de contamination que la méthode PCR classique.

[29] À l'exception de la méthode IC-RT-PCR, dans laquelle IC indique l'immunocapture, (pour laquelle il n'est pas nécessaire d'isoler l'ARN), l'extraction d'ARN devrait être effectuée en utilisant des protocoles validés. Les échantillons devraient être placés dans des sachets en plastique individuels afin

d'éviter les contaminations croisées lors de l'extraction. En ce qui concerne la méthode RT-PCR en temps réel, des extraits de végétaux présentant des taches, des empreintes de sections de tissus ou des broyats de matériel végétal peuvent être immobilisés sur du papier buvard ou des membranes en nylon et analysés par la méthode RT-PCR en temps réel (Olmos *et al.*, 2005; Osman et Rowhani, 2006; Capote *et al.*, 2009). Il n'est pas recommandé d'utiliser des extraits de végétaux présentant des taches ou des échantillons sous forme d'empreintes dans la méthode PCR classique parce qu'elle est moins sensible que la méthode RT-PCR en temps réel.

[30] Chaque méthode indique le volume de l'échantillon extrait qui devrait être utilisé comme matrice. Selon la sensibilité de la méthode, la concentration minimale de matrice nécessaire pour détecter le PPV varie comme suit: RT-PCR, 100 fg · 1 ml⁻¹ de matrice d'ARN; Co-RT-PCR, 1 fg · 1 ml⁻¹ de matrice d'ARN ml; et RT-PCR en temps réel, 2 fg · 1 ml⁻¹ de matrice d'ARN.

[31] 3.3.1 Transcription inverse suivie d'une réaction d'amplification génique (RT-PCR)

[32] Les amorces RT-PCR utilisées dans cette analyse sont soit celles de Wetzel *et al.* (1991):

P1 (5'-ACC GAG ACC ACT ACA CTC CC-3')

P2 (5'-CAG ACT ACA GCC TCG CCA GA-3'),

soit celles de Levy et Hadidi (1994):

3'NCR sens (5'-GTA GTG GTC TCG GTA TCT ATC ATA-3')

3'NCR antisens (5'-GTC TCT TGC ACA AGA ACT ATA ACC-3').

[33] Le milieu réactif de 25 µl est composé comme suit: 1 µM de chaque amorce (P1/P2 ou la paire d'amorces 3'NCR), 250 µM de dNTP, 1 unité de transcriptase inverse AMV, 0,5 unité de Taq ADN polymérase, 2,5 µl de tampon de Taq polymérase 10 ×, 1,5 mM de MgCl₂, Triton X-100 à 0,3 pour cent et 5 µl de matrice d'ARN. La réaction se produit dans les conditions de thermocyclage suivantes: 45 min à 42 °C, 2 min à 94 °C, 40 cycles de 30 s à 94 °C, 30 s à 60 °C (amorces P1/P2) ou 62 °C (amorces 3'NCR) et 1 min à 72 °C, suivie d'une période finale de 10 min à 72 °C. Les produits de la PCR sont analysés par électrophorèse sur gel. Les amorces P1/P2 et 3'NCR produisent 243 paires de base (pb) et un amplicon de 220 pb, respectivement.

[34] La méthode de Wetzel *et al.* (1991) a été évaluée en analysant des isolats de PPV de zones méditerranéennes (Chypre, Égypte, Espagne, France, Grèce et Turquie). L'examen a permis de détecter 10 fg d'ARN viral, correspondant à 2 000 particules virales (Wetzel *et al.*, 1991). La méthode de Levy et Hadidi (1994) a été évaluée en utilisant des isolats de PPV d'Allemagne, d'Égypte, d'Espagne, de France, de Grèce, de Hongrie, d'Italie et de Roumanie.

[35] 3.3.2 Immunocapture - transcription inverse suivie d'une réaction d'amplification génique (IC-RT-PCR)

[36] La phase d'immunocapture devrait être effectuée selon Wetzel *et al.* (1992), en utilisant de la sève végétale extraite conformément à la section 3.2, placée dans des tubes ou sachets en plastique individuels pour éviter la contamination.

[37] Préparer une dilution (1 µg ml⁻¹) d'antisérums polyclonaux ou contenant un antisérum monoclonal spécifique au PPV (5B-IVIA) dans un tampon de carbonate dont le pH est 9,6. Ajouter 100 µl d'antisérums dilués dans des tubes PCR et incubé à 37 °C pendant 3 h. Laver les tubes deux fois avec 150 µl de Tween PBS stérile (tampon de lavage). Rincer les tubes deux fois avec de l'eau exempte de Rnase. Clarifier 100 µl d'extrait végétal (voir la section 3.2) par centrifugation (5 min à 15 500 × g), et ajouter le surnageant aux tubes PCR sensibilisés. Incuber pendant deux heures sur de la glace ou à 37 °C. Laver les tubes trois fois avec 150 µl de Tween PBS stérile (tampon de lavage). Préparer le milieu réactif de la RT-PCR selon les modalités décrites dans la section 3.3.1 en utilisant les amorces de Wetzel *et al.* (1992) et les ajouter directement aux tubes PCR sensibilisés. Effectuer l'amplification selon les modalités décrites dans la section 3.3.1.

[38] La méthode IC-RT-PCR nécessite généralement l'emploi d'antisérums spécifiques, mais les méthodes de fixation directe peuvent en rendre l'usage superflu. La méthode IC-RT-PCR utilisant l'antisérum monoclonal 5B-IVIA a été validée dans un examen comparatif DIAGPRO présentant une précision de 82 pour cent pour la détection du PPV (Cambra *et al.*, 2006c; Olmos *et al.*, 2007). D'après Capote *et al.* (2009), il existe une probabilité de 95,8 pour cent qu'un résultat positif obtenu en hiver avec la méthode IC-RT-PCR en utilisant l'antisérum monoclonal 5B-IVIA soit un vrai positif.

[39] 3.3.3 Méthode coopérationnelle transcription inverse suivie d'une réaction d'amplification génique (Co-RT-PCR)

[40] Les amorces RT-PCR utilisées dans cette analyse coopérationnelle sont les amorces d'Olmos, Bertolini et Cambra (2002):

Amorce interne P1 (5'-ACC GAG ACC ACT ACA CTC CC-3')

Amorce interne P2 (5'-CAG ACT ACA GCC TCG CCA GA-3')

Amorce externe P10 (5'-GAG AAA AGG ATG CTA ACA GGA-3')

Amorce externe P20 (5'-AAA GCA TAC ATG CCA AGG TA-3').

[41] Le milieu réactif de 25 µl est composé comme suit: 0,1 µM d'amorces P1 et P2, 0,05 µM d'amorces P10 et P20, 400 µM de dNTP, 2 unités d'AMV transcriptase inverse, 1 unité de Taq polymérase (ADN), 2 µl de tampon réactif 10 ×, 3 mM de MgCl₂, DMSO à 5 pour cent, Triton X-100 à 0,3 pour cent et 5 µl de matrice d'ARN. La méthode RT-PCR est appliquée dans les conditions de thermocyclage suivantes: 45 min à 42 °C, 2 min à 94 °C, 60 cycles de 15 s à 94 °C, 15 s à 50 °C, 30 s à 72 °C, suivi d'une période de 10 min à 72 °C.

[42] La réaction RT-PCR est associée à une détection colorimétrique d'amplicons utilisant une sonde universelle à PPV étiquetée de 3'digoxigénine (DIG) (5'-TCG TTT ATT TGG CTT GGA TGG AA-DIG-3'). On procède comme suit: dénaturer l'ADNc amplifié à 95 °C pendant 5 min et le placer immédiatement sur de la glace. Placer 1 µl d'échantillon sur une membrane en nylon. Sécher la membrane à température ambiante et procéder à la réticulation par UV dans un transilluminateur pendant 4 min à 254 nm. Pour la préhybridation, placer la membrane dans un tube à hybridation à 60 °C pendant 1 h en utilisant un tampon d'hybridation normalisé. Jeter la solution et effectuer l'hybridation en mélangeant la sonde étiquetée 3'DIG avec un tampon d'hybridation normalisé à une concentration finale de 10 pmol ml⁻¹, avant d'incuber pendant 2 h à 60 °C. Laver la membrane deux fois pendant 15 min à la température ambiante avec de la solution de lavage concentrée à 2 × et deux fois pendant 15 min à la température ambiante avec de la solution de lavage à 0,5 ×. Équilibrer la membrane pendant 2 min dans un tampon de lavage avant de la tremper pendant 30 min dans une solution de blocage stérilisée à 1 pour cent (1 g de réactif de blocage dissous dans 100 ml de tampon à l'acide maléique). Incuber la membrane à température ambiante avec des antisérums anti-DIG conjugués à la phosphatase alcaline à une concentration de 1:5 000 (150 unités litre⁻¹) dans une solution de blocage à 1 pour cent (p/v) pendant 30 min. Laver la membrane deux fois pendant 15 min avec un tampon de lavage et équilibrer pendant 2 min avec un tampon de détection (100 mM de Tris-HCl, 100 mM de NaCl, pH 9,5). On prépare la solution du substrat en mélangeant 45 µl d'une solution de NBT (75 mg ml⁻¹ de sel de nitrobleu de tétrazolium dans du diméthylformamide à 70 pour cent (v/v)) et 35 µl d'une solution de BCIP (50 mg · ml⁻¹ 5-bromo-4chloro-3indolyl phosphate toluidine dans du diméthylformamide à 100 pour cent) dans 10 ml de tampon de détection. Après l'incubation avec le substrat, interrompre la réaction en lavant à l'eau.

[43] Cette méthode était cent fois plus sensible que la méthode RT-PCR utilisant l'analyse de Wetzel *et al.* (1991) (Olmos, Bertolini et Cambra, 2002). Elle a été validée dans l'essai comparatif DIAGPRO et présente une précision de 94 pour cent (Cambra *et al.*, 2006c; Olmos *et al.*, 2007).

[44] 3.3.4 Transcription inverse suivie d'une réaction d'amplification génique en temps réel (RT-PCR en temps réel)

[45] La RT-PCR en temps réel peut être effectuée en utilisant le TaqMan ou le SYBR Green I. Deux méthodes TaqMan ont été décrites pour la détection universelle du PPV (Schneider *et al.*, 2004; Olmos *et al.*, 2005). Les amorces et la sonde TaqMan utilisées dans la première analyse sont celles étudiés par Schneider *et al.* (2004):

Amorce directe (5'-CCA ATA AAG CCA TTG TTG GAT C-3')

Amorce inverse (5'-TGA ATT CCA TAC CTT GGC ATG T-3')

Sonde TaqMan (5'-FAM-CTT CAG CCA CGT TAC TGA AAT GTG CCA-TAMRA-3').

[46] Le mélange réactif de 25 µl est composé comme suit: mélange réactif à 1 × (0,2 mM de chaque dNTP et 1,2 mM de MgSO₄), 200 nM d'amorces directe et inverse, une sonde TaqMan de 100 nM, 4,8 mM de MgSO₄, 0,5 µl de mélange RT/Platinum[®] Taq (Superscript[™] One-Step RT-PCR avec un kit Platinum[®] Taq; Invitrogen)¹ et 5 µl de matrice d'ARN. La RT-PCR est effectuée dans les conditions de thermocyclage suivantes: 15 min à 52 °C, 5 min à 95 °C, 60 cycles de 15 s à 95 °C et 30 s à 60 °C. Les produits de la PCR sont analysés en temps réel conformément aux instructions du fabricant du matériel.

[47] La méthode de Schneider *et al.* (2004) a été évaluée par analyse d'isolats de PPV provenant des États-Unis, de souches PPV-C, PPV-D, PPV-EA et PPV-M et de huit autres espèces virales. La méthode était spécifique et a permis de détecter régulièrement de 10 à 20 fg d'ARN viral (Schneider *et al.*, 2004). La méthode a aussi permis de détecter le PPV dans un certain nombre d'hôtes et dans les feuilles, les tiges, les bourgeons et les racines de *P. persica*.

[48] Les amorces et la sonde TaqMan utilisées dans la deuxième analyse sont ceux étudiés par Olmos *et al.* (2005):

Amorce P241 (5'-CGT TTA TTT GGC TTG GAT GGA A-3')

Amorce P316D (5'-GAT TAA CAT CAC CAG CGG TGT G-3')

Amorce P316M (5'-GAT TCA CGT CAC CAG CGG TGT G-3')

Sonde PPV-DM (5'-FAM-CGT CGG AAC ACA AGA AGA GGA CAC AGA-TAMRA-3').

[49] Le mélange réactif de 25 µl est composé comme suit: 1 µM d'amorce P241, 0,5 µM d'amorce P316D et d'amorce P316M, 200 nM de sonde TaqMan, TaqMan Universal PCR Master Mix 1 × (Applied Biosystems)², MultiScribe et RNase Inhibitor Mix 1 × (Applied Biosystems)³ et 5 µl de matrice d'ARN. La RT-PCR est effectuée dans les conditions de thermocyclage suivantes: 30 min à 48 °C, 10 min à 95 °C, 40 cycles de 15 s à 95 °C et 60 s à 60 °C. Les produits de la PCR sont analysés en temps réel conformément aux instructions du fabricant de l'équipement.

[50] La méthode d'Olmos *et al.* (2005) a été évaluée en utilisant trois isolats d'un PPV-D et trois isolats d'un PPV-M, et elle s'est avérée mille fois plus sensible que la méthode DAS-ELISA utilisant l'antisérum monoclonal 5B-IVIA. La proportion de vrais positifs (nombre de vrais positifs

¹ L'emploi de la marque Invitrogen pour le Superscript[™] One-Step RT-PCR avec le kit Platinum[®] Taq dans ce protocole de diagnostic n'implique aucune approbation de ceux-ci à l'exclusion d'autres qui peuvent aussi convenir. Cette information est donnée pour la commodité des utilisateurs du présent protocole et ne constitue pas une approbation par la CMP du produit chimique, du réactif ni du matériel cité. Des produits équivalents peuvent être utilisés s'il est possible de démontrer qu'ils permettent d'obtenir les mêmes résultats.

² L'emploi de la marque Applied Biosystems pour le TaqMan Universal PCR Master Mix, le MultiScribe et le RNase Inhibitor Mix dans ce protocole de diagnostic n'implique aucune approbation de ceux-ci à l'exclusion d'autres qui peuvent aussi convenir. Cette information est donnée pour la commodité des utilisateurs du présent protocole et ne constitue pas une approbation par la CMP du produit chimique, du réactif ni du matériel cité. Des produits équivalents peuvent être utilisés s'il est possible de démontrer qu'ils permettent d'obtenir les mêmes résultats.

³ Voir note 2.

diagnostiqués par cette technique par rapport au nombre de végétaux infectés par le PPV) identifiés correctement par la RT-PCR en temps réel utilisant le TaqMan (Olmos *et al.*, 2005) et un acide nucléique purifié était de 97,5 pour cent, chiffre à comparer avec ceux de la RT-PCR en temps réel utilisant des échantillons prélevés sur des végétaux présentant des taches (93,6 pour cent), de l'immunocapture RT-PCR (91,5 pour cent) ou de la méthode DASI-ELISA utilisant l'antisérum monoclonal 5B-IVIA (86,6 pour cent) (Capote *et al.*, 2009).

[51] Varga et James (2005) ont décrit une méthode SYBR Green I pour la détection simultanée du PPV et l'identification des souches D et M:

P1 (5'-ACC GAG ACC ACT ACA CTC CC-3')
PPV-U (5'-TGA AGG CAG CAG CAT TGA GA-3')
PPV-FD (5'-TCA ACG ACA CCC GTA CGG GC-3')
PPV-FM (5'-GGT GCA TCG AAA ACG GAA CG-3')
PPV-RR (5'-CTC TTC TTG TGT TCC GAC GTT TC-3').

[52] Les amorces qui amplifient un contrôle interne suivantes peuvent être incluses pour vérifier le fonctionnement correct de l'analyse:

Nad5-F (5'-GAT GCT TCT TGG GGC TTC TTG TT-3')
Nad5-R (5'-CTC CAG TCA CCA ACA TTG GCA TAA-3').

[53] On utilise un protocole RT-PCR en deux étapes. Pour la réaction RT, on procède comme suit: 2 µl de 10 µM d'amorce P1, 2 µl de 10 µM d'amorce Nad5-R, 4 µg d'ARN total et 5 µl d'eau. Incuber à 72 °C pendant 5 min, puis placer sur de la glace. Ajouter 4 µl de tampon premier brin 5 × (Invitrogen)⁴, 2 µl 0,1 M de DTT, 1 µl 10 mM de dNTP, 0,5 µl de RNaseOUT™ (40 unités µl⁻¹) (Invitrogen)⁵, 1 µl de Superscript™ II (Invitrogen)⁶ et 2,5 µl d'eau. Incuber à 42 °C pendant 60 min, puis à 99 °C pendant 5 min. Le milieu réactionnel de 24 µl de la PCR est composé comme suit: 400 nM d'amorce PPV-U, 350 nM d'amorce PPV-FM, 150 nM d'amorce PPV-FD, 200 nM d'amorce PPV-RR, 100 nM d'amorce Nad5-F, 100 nM d'amorce Nad5-R, 200 µM de dNTP, 2 mM de MgCl₂, tampon Karsai 1 × (Karsai *et al.*, 2002), 1:42 000 de SYBR Green I (Sigma)⁷ et 0,1 µl de Platinum® Taq DNA high fidelity polymerase (Invitrogen). Le milieu réactionnel et 1 µl de cDNA dilué (1:4) sont ajoutés à un tube PCR stérile. La PCR est effectuée dans les conditions de thermocyclage suivantes: 2 min à 95 °C, 39 cycles de 15 s à 95 °C, et 60 s à 60 °C. L'analyse de la courbe de fusion est effectuée par incubation à des températures de 60 °C à 95 °C par paliers de fusion de 0,1 °C s⁻¹ avec une courbe lissée en moyenne à 1 point. Dans les conditions décrites par Varga et James (2005), les températures de fusion de chaque produit sont les suivantes:

Détection universelle du PPV (fragment de 74 pb): 80,08 – 81,52 °C
Souches D (fragment de 114 pb): 84,3 – 84,43 °C
Souches M (fragment de 380 pb): 85,34 – 86,11 °C
Contrôle interne (fragment de 181 pb): 82,45 – 82,63 °C.

⁴ L'emploi de la marque Invitrogen pour le tampon, RNaseOUT™, Superscript™ II et de Platinum® Taq DNA high fidelity polymerase dans ce protocole de diagnostic n'implique aucune approbation de ceux-ci à l'exclusion d'autres qui peuvent aussi convenir. Cette information est donnée pour la commodité des utilisateurs du présent protocole et ne constitue pas une approbation par la CMP du produit chimique, du réactif ni du matériel cité. Des produits équivalents peuvent être utilisés s'il est possible de démontrer qu'ils permettent d'obtenir les mêmes résultats.

⁵ Voir note 4.

⁶ Voir note 4.

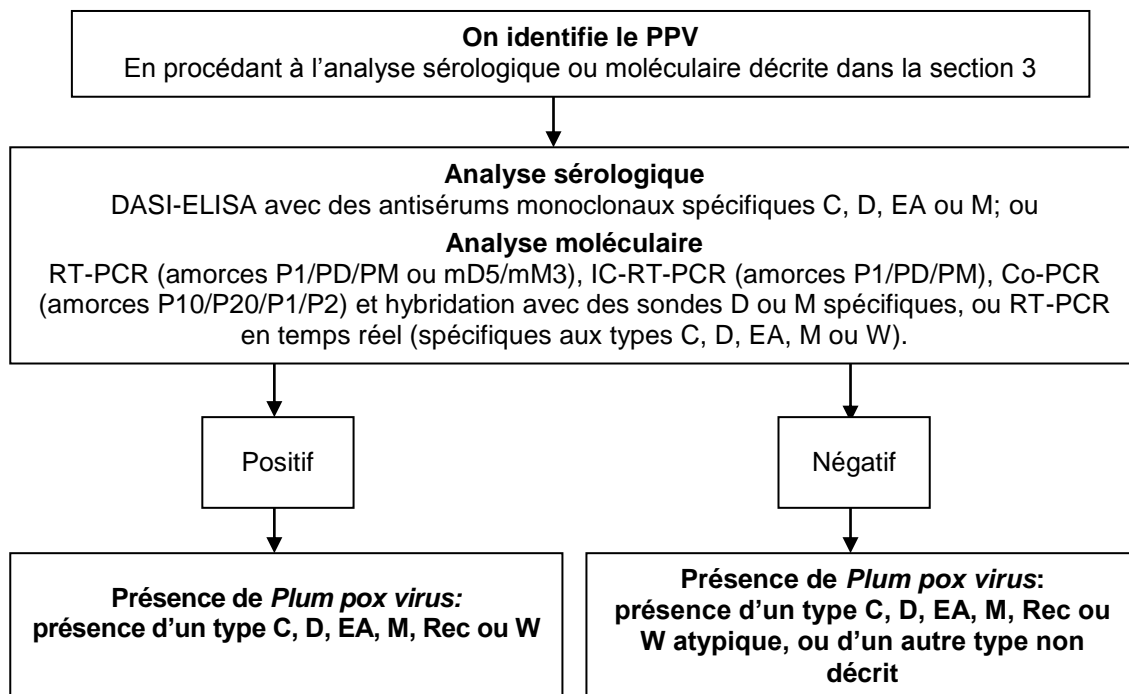
⁷ L'emploi de la marque Sigma pour le SYBR Green I dans ce protocole de diagnostic n'implique aucune approbation de ceux-ci à l'exclusion d'autres qui peuvent aussi convenir. Cette information est donnée pour la commodité des utilisateurs du présent protocole et ne constitue pas une approbation par la CMP du produit chimique, du réactif ni du matériel cité. Des produits équivalents peuvent être utilisés s'il est possible de démontrer qu'ils permettent d'obtenir les mêmes résultats.

[54] La méthode de Varga et James (2005) a été évaluée en utilisant des isolats de PPV-C, PPV-D, PPV-EA, PPV-M et une souche non caractérisée pour les espèces *Nicotiana* et *Prunus*.

[55] 4. Identification des souches

[56] La présente section décrit d'autres méthodes (faisant appel à DASI-ELISA, à la RT-PCR, à la Co-RT-PCR et à la RT-PCR en temps réel) d'identification des souches de PPV (voir la figure 1). L'identification de la souche n'est pas un élément indispensable de l'identification du PPV, mais une ONPV peut souhaiter déterminer l'identité de la souche pour être capable de prévoir son comportement épidémiologique.

[57] Compte tenu de la variabilité du PPV, des techniques autres que celles du séquençage ou certains dosages fondés sur la PCR (voir ci-dessous) pourraient produire des résultats erronés avec un petit pourcentage d'isolats. Cependant, il est généralement possible de différencier les types D et M de PPV en utilisant les techniques sérologiques et moléculaires décrites ci-après (Cambra *et al.*, 2006a; Candresse et Cambra, 2006; Capote *et al.*, 2006).



[58] **Figure 1:** Méthodes d'identification des souches de *Plum pox virus*.

[59] D'autres analyses peuvent être conduites lorsque l'ONPV exige un niveau de confiance plus élevé dans l'identification du type de PPV. On devrait aussi procéder au séquençage du génome complet du PPV ou de tout ou partie de la protéine d'enveloppe, de la protéine P3-6K1 et des gènes des protéines d'inclusion cytoplasmique en présence de types atypiques ou non décrits.

[60] 4.1 Identification sérologique des souches

[61] La méthode DASI-ELISA, qui sert à distinguer les deux types de PPV (D et M), devrait être appliquée selon les indications de Cambra *et al.* (1994), en utilisant des antisérums monoclonaux spécifiques aux types D et M (Cambra *et al.*, 1994; Boscia *et al.*, 1997) et conformément aux instructions du fabricant.

[62] Cette méthode a été validée dans l'examen comparatif DIAGPRO et présente une précision de 84 pour cent pour la détection du PPV-D et de 89 pour cent pour la détection du PPV-M (Cambra *et al.*, 2006c; Olmos *et al.*, 2007). L'antisérum monoclonal 4D est spécifique au PPV-D mais il ne réagit pas avec

tous les isolats du PPV-D. Par ailleurs, l'antisérum monoclonal AL utilisé pour la détection du PPV-M réagit avec des isolats appartenant aux souches M, Rec et T car ces groupes ont en commun la même séquence de la protéine d'enveloppe. Une analyse moléculaire est donc requise pour distinguer les types M et Rec détectés en utilisant un antisérum monoclonal spécifique au type M.

[63] L'identification sérologique des isolats de PPV des groupes EA et C peut être effectuée par la méthode DASI-ELISA utilisant les antisérums monoclonaux spécifiques à EA et/ou à C décrits par Myrta *et al.* (1998, 2000). Cependant, ces analyses doivent être validées.

[64] 4.2 Identification moléculaire des souches

[65] 4.2.1 Transcription inverse suivie d'une réaction d'amplification génique

[66] Les types PPV-D et PPV-M sont identifiés en utilisant les amorces décrites par Olmos *et al.* (1997):

P1 (5'-ACC GAG ACC ACT ACA CTC CC-3')

PD (5'-CTT CAA CGA CAC CCG TAC GG-3') ou PM (5'-CTT CAA CAA CGC CTG TGC GT -3').

[67] Le mélange réactif de 25 µl est composé comme suit: 1 µM d'amorce P1, 1 µM d'amorce PD ou PM, 250 µM de dNTP, 1 unité d'AMV transcriptase inverse (10 unités µl⁻¹), 0,5 unité de Taq DNA polymérase (5 unités µl⁻¹), 2,5 µl de tampon de Taq polymérase 10 ×, 1,5 mM de MgCl₂, 0,3 pour cent de Triton X-100, formamide à 2 pour cent et 5 µl de matrice d'ARN. La RT-PCR est effectuée dans les conditions de thermocyclage suivantes: 45 min à 42 °C, 2 min à 94 °C, 40 cycles de 30 s à 94 °C, 30 s à 60 °C, 1 min à 72 °C, suivie d'une prolongation finale de 10 min à 72 °C. Les produits de la PCR sont analysés par électrophorèse sur gel. Les amorces P1/PD et P1/PM produisent un amplicon de 198 pb. La méthode a été évaluée sur six isolats de PPV-D et quatre isolats de PPV-M.

[68] On identifie le PPV-Rec en utilisant les amorces mD5/mM3 spécifiques au type Rec décrites par Šubr *et al.* (2004):

mD5 (5'-TAT GTC ACA TAA AGG CGT TCT C-3')

mM3 (5'-CAT TTC CAT AAA CTC CAA AAG AC-3').

[69] Le mélange réactif de 25 µl est composé comme suit (adapté de Šubr *et al.*, 2004): 1 µM de chaque amorce, 250 µM de dNTP, 1 unité d'AMV transcriptase inverse (10 unités µl⁻¹), 0,5 unité de Taq DNA polymérase (5 unités µl⁻¹), 2,5 µl de tampon Taq polymérase 10 ×, 2,5 mM de MgCl₂, Triton X-100 à 0,3 pour cent et 5 µl d'extrait d'ARN (voir la section 3.3). Le produit PCR de 605 pb est analysé par électrophorèse sur gel.

[70] 4.2.2 Immunocapture - transcription inverse suivie d'une réaction d'amplification génique

[71] La phase d'immunocapture devrait être réalisée selon les indications de la section 3.3.2. Le mélange réactif de la PCR est ajouté directement aux tubes PCR sensibilisés. L'identification des types PPV-D et PPV-M est effectuée conformément aux indications de la section 4.2.1.

[72] 4.2.3 Méthode coopérative transcription inverse suivie d'une réaction d'amplification génique

[73] L'identification des types PPV-D ou PPV-M devrait être effectuée selon les indications de la section 3.3.3 en utilisant des sondes 3' étiquetées avec de la DIG et spécifiques aux souches D et M (Olmos, Bertolini et Cambra, 2002):

Sonde spécifique PPV-D: 5'-CTT CAA CGA CAC CCG TAC GGG CA-DIG-3'

Sonde spécifique PPV-M: 5'-AAC GCC TGT GCG TGC ACG T-DIG-3'.

[74] Les étapes de préhybridation et d'hybridation se déroulent à 50 °C et comprennent des tampons de préhybridation et d'hybridation + formamide à 30 pour cent (pour l'identification du PPV-D) et +

formamide à 50 pour cent (pour l'identification du PPV-M). La solution de blocage utilisée est à 2 pour cent (p/v).

[75] 4.2.4 Transcription inverse suivie d'une réaction d'amplification génique en temps réel

[76] Les types PPV-D et PPV-M sont spécifiquement identifiés en utilisant soit le fluorophore SYBR Green I selon la méthode de Varga et James (2005) (voir la section 3.3.4), soit la méthode TaqMan décrite par Capote *et al.* (2006).

[77] Les amorces et les sondes TaqMan utilisées dans la méthode de Capote *et al.* (2006) sont:

l'amorce PPV-MGB-F (5'-CAG ACT ACA GCC TCG CCA GA-3')

l'amorce PPV-MGB-R (5'-CTC AAT GCT GCT GCC TTC AT-3')

la sonde MGB-D (5'-FAM-TTC AAC GAC ACC CGT A-MGB-3')

la sonde MGB-M (5'-FAM-TTC AAC AAC GCC TGT G-MGB-3').

[78] Le milieu réactif de 25 µl est composé comme suit: 1 µM de chaque amorce, 150 nM de sonde MGB-D ou MGB-M FAM, TaqMan Universal PCR Master Mix 1 × (Applied Biosystems)⁸, MultiScribe and RNase Inhibitor Mix 1 × (Applied Biosystems)⁹ et 5 µl de matrice d'ARN (voir la section 3.3). La RT-PCR est effectuée dans les conditions de thermocyclage suivantes: 30 min à 48 °C, 10 min à 95 °C, 40 cycles de 15 s à 95 °C et 60 s à 60 °C. Les produits de la PCR sont analysés en temps réel conformément aux instructions du fabricant. La méthode a été évaluée sur 12 isolats de PPV-D, 12 isolats de PPV-M, et 14 échantillons coinfectés par les deux types.

[79] Les types PPV-C, PPV-EA et PPV-W sont spécifiquement identifiés en utilisant le fluorophore SYBR Green I conformément à la méthode de Varga et James (2006). Les amorces utilisées dans cette méthode sont les suivantes:

P1 (5'-ACC GAG ACC ACT ACA CTC CC-3')

PPV-U (5'-TGA AGG CAG CAG CAT TGA GA-3')

PPV-RR (5'-CTC TTC TTG TGT TCC GAC GTT TC-3').

[80] Les amorces qui amplifient un contrôle interne suivantes peuvent être incluses pour vérifier le fonctionnement correct de l'analyse:

Nad5-F (5'-GAT GCT TCT TGG GGC TTC TTG TT-3')

Nad5-R (5'-CTC CAG TCA CCA ACA TTG GCA TAA-3').

[81] Le milieu réactif de 25 µl de la RT-PCR est composé comme suit: 2,5 µl d'une dilution aqueuse à 1:10 (v/v) d'ARN extrait (voir la section 3.3) et 22,5 µl de mélange principal. La composition de ce mélange principal est la suivante: 2,5 µl de tampon Karsai (Karsai *et al.*, 2002); 0,5 µl de chacun des 5 µM d'amorce de PPV-U, de PPV-RR ou de P1, de Nad5R et de Nad5F; 0,5 µl de 10 mM de dNTP; 1 µl de 50 mM de MgCl₂; 0,2 µl de RNaseOUT™ (40 unités µl⁻¹; Invitrogen)¹⁰; 0,1 µl de Superscript™ III (200 unités µl⁻¹; Invitrogen)¹¹; 0,1 µl de Platinum® Taq DNA high fidelity polymerase (5 unités µl⁻¹,

⁸ L'emploi de la marque Applied Biosystems pour le TaqMan Universal PCR Master Mix, le MultiScribe et le RNase Inhibitor Mix dans ce protocole de diagnostic n'implique aucune approbation de ceux-ci à l'exclusion d'autres qui peuvent aussi convenir. Cette information est donnée pour la commodité des utilisateurs du présent protocole et ne constitue pas une approbation par la CMP du produit chimique, du réactif ni du matériel cité. Des produits équivalents peuvent être utilisés s'il est possible de démontrer qu'ils permettent d'obtenir les mêmes résultats.

⁹ Voir note 8.

¹⁰ L'emploi de la marque Invitrogen pour le tampon, RNaseOUT™, Superscript™ II et de Platinum® Taq DNA high fidelity polymerase dans ce protocole de diagnostic n'implique aucune approbation de ceux-ci à l'exclusion d'autres qui peuvent aussi convenir. Cette information est donnée pour la commodité des utilisateurs du présent protocole et ne constitue pas une approbation par la CMP du produit chimique, du réactif ni du matériel cité. Des produits équivalents peuvent être utilisés s'il est possible de démontrer qu'ils permettent d'obtenir les mêmes résultats.

¹¹ Voir note 10.

Invitrogen)¹²; et 1 µl de 1:5 000 (dans TE, pH 7,5) SYBR Green I (Sigma)¹³ dans 16,1 µl d'eau. La réaction est effectuée dans les conditions de thermocyclage suivantes: 10 min à 50 °C, 2 min à 95 °C, 29 cycles de 15 s à 95 °C et 60 s à 60 °C. L'analyse de la courbe de fusion est conduite par incubation à des températures de 60 °C à 95 °C par paliers de fusion de 0,1 °C s⁻¹ avec une courbe lissée en moyenne à 1 point. Dans les conditions décrites par Varga et James (2006), les températures de fusion pour chaque produit sont les suivantes:

Souche C (fragment de 74 pb): 79,84 °C

Souche EA (fragment de 74 pb): 81,27 °C

Souche W (fragment de 74 pb): 80,68 °C.

[82] Cette méthode a été évaluée en utilisant un isolat de chaque type: PPV-C, PPV-D, PPV-EA et PPV-W.

[83] 5. Données à enregistrer

[84] Les données à enregistrer sont énumérées dans la section 2.5 de la NIMP 27:2006.

[85] Dans les cas où d'autres parties contractantes peuvent être concernées par les résultats de la diagnose, notamment en cas de non-conformité et lorsque le virus est identifié dans une zone pour la première fois, le matériel complémentaire suivant devrait être conservé:

- L'échantillon original (étiqueté comme il convient pour la traçabilité) devrait être conservé à -80 °C ou lyophilisé et conservé à température ambiante.
- Le cas échéant, les extractions d'ARN devraient être conservées à -80 °C et/ou les extraits de végétaux présentant des taches ou les empreintes de sections de tissus sur du papier ou des membranes de nylon devraient être conservés à température ambiante.
- Le cas échéant, les produits de l'amplification RT-PCR devraient être conservés à -20 °C.

[86] 6. Points de contact pour tout complément d'information

APHIS PPQ PHP RIPPS, Molecular Diagnostic Laboratory, BARC Building 580, Powder Mill Road, Beltsville, Maryland 20705, États-Unis d'Amérique (Dr. Laurene Levy, courriel: Laurene.Levy@aphis.usda.gov; tél.: +1 3015045700; Télécopie: +1 3015046124).

Équipe de virologie, Institut national de la recherche agronomique (INRA), Centre de Bordeaux, UMR GD2P, IBVM, BP 81, 33883 Villenave d'Ornon Cedex, France (Dr. Thierry Candresse, courriel: tc@bordeaux.inra.fr; tél.: +33 557122389; télécopie: +33 557122384).

Faculty of Horticultural Science, Department of Plant Pathology, Corvinus University, Villányi út 29-43, 1118 Budapest, Hongrie (Dr. Laszlo Palkovics, courriel: laszlo.palkovics@uni-corvinus.hu; tél.: +36 14825438; Télécopie: +36 14825023).

Institute of Virology, Slovak Academy of Sciences, Dúbravská, 84505 Bratislava, Slovaquie (Dr. Miroslav Glasa, courriel: virumig@savba.sk; tél.: +421 259302447; télécopie: +421 254774284).

Instituto Valenciano de Investigaciones Agrarias (IVIA), Plant Protection and Biotechnology Centre, Carretera Moncada-Náquera km 5, 46113 Moncada (Valencia), Espagne (Dr. Mariano Cambra, courriel: mcambra@ivia.es; tél.: +34 963424000; télécopie: +34 963424001).

Istituto di Virologia Vegetale del CNR, sezione di Bari, via Amendola 165/A, 70126 Bari, Italie (Dr. Donato Boscia, courriel: d.boscia@ba.ivv.cnr.it; tél.: +39 0805443067; télécopie: +39 0805442911).

¹² Voir note 10.

¹³ L'emploi de la marque Sigma pour le SYBR Green I dans ce protocole de diagnostic n'implique aucune approbation de ceux-ci à l'exclusion d'autres qui peuvent aussi convenir. Cette information est donnée pour la commodité des utilisateurs du présent protocole et ne constitue pas une approbation par la CMP du produit chimique, du réactif ni du matériel cité. Des produits équivalents peuvent être utilisés s'il est possible de démontrer qu'ils permettent d'obtenir les mêmes résultats.

Sidney Laboratory, Agence canadienne d'inspection des aliments (ACIA) – Colombie-Britannique, V8L 1H3 Sidney, Canada (Dr. Delano James, courriel: Delano.James@inspection.gc.ca; tél.: +1 250 3636650; télécopie: +1 250 3636661).

Virology Laboratory, Centre technique interprofessionnel des fruits et légumes (CTIFL), BP 21 Lanxade, 24130 La Force, France (Dr. Pascal Gentit, courriel: gentit@ctifl.fr; tél.: +33 553580005; télécopie: +33 553 581742).

[87] 7. Auteurs et collaborateurs

[88] Le présent protocole de diagnostic a été rédigé par M. Cambra, A. Olmos et N. Capote, IVIA (voir la section précédente), N. L. Africander, Department of Agriculture, Forestry and Fisheries, Private Bag X 5015, Stellenbosch, 75999, Afrique du Sud; L. Levy (voir section précédente); S. L. Lenardon, IFFIVE-INTA, Cno. 60 Cuadras Km 51/2, Córdoba X5020ICA, Argentine; G. Clover, Plant Health & Environment Laboratory, Ministry of Agriculture and Forestry, PO Box 2095, Auckland 1140, Nouvelle-Zélande, et D. Wright, Plant Health Group, Central Science Laboratory, Sand Hutton, York YO41 1LZ, Royaume-Uni.

[89] 8. Références

- Barba, M., Hadidi, A., Candresse, T. et Cambra, M.** 2011. *Plum pox virus*. A. Hadidi, M. Barba, T. Candresse et W. Jelkmann (sous la direction de). *Virus and virus-like diseases of pome and stone fruits*, Chap. 36. St. Paul, MN, APS Press. 428 pp.
- Boscia, D., Zeramdini, H., Cambra, M., Potere, O., Gorris, M. T., Myrta, A., DiTerlizzi, B. et Savino, V.** 1997. Production and characterization of a monoclonal antibody specific to the M serotype of plum pox potyvirus. *European Journal of Plant Pathology*, 103: 477–480.
- CAB International.** 2011. Crop Protection Compendium. <http://www.cabi.org/cpc/>, document consulté le 26 octobre 2011.
- Cambra, M., Asensio, M., Gorris, M.T., Pérez, E., Camarasa, E., García, J. A., Moya, J. J., López-Abella, D., Vela, C. et Sanz, A.** 1994. Detection of plum pox potyvirus using monoclonal antibodies to structural and non-structural proteins. *Bulletin OEPP/EPPO Bulletin*, 24: 569–577.
- Cambra, M., Boscia, D., Myrta, A., Palkovics, L., Navrátil, M., Barba, M., Gorris, M. T. et Capote, N.** 2006a. Detection and characterization of *Plum pox virus*: serological methods. *Bulletin OEPP/EPPO Bulletin*, 36: 254–261.
- Cambra, M., Capote, N., Myrta, A. et Llácer, G.** 2006b. *Plum pox virus* and the estimated costs associated with sharka disease. *Bulletin OEPP/EPPO Bulletin*, 36: 202–204.
- Cambra, M., Capote, N., Olmos, A., Bertolini, E., Gorris, M. T., Africander, N. L., Levy, L., Lenardon, S. L., Clover, G. et Wright, D.** 2006c. Proposal for a new international protocol for detection and identification of *Plum pox virus*. Validation of the techniques. *Acta Horticulturae*, 781: 181–191.
- Candresse, T. et Cambra, M.** 2006. Causal agent of sharka disease: historical perspective and current status of *Plum pox virus* strains. *Bulletin OEPP/EPPO Bulletin*, 36: 239–246.
- Capote, N., Bertolini, E., Olmos, A., Vidal, E., Martínez, M. C. et Cambra, M.** 2009. Direct sample preparation methods for detection of *Plum pox virus* by real-time RT-PCR. *International Microbiology*, 12: 1–6.
- Capote, N., Gorris, M. T., Martínez, M. C., Asensio, M., Olmos, A. et Cambra, M.** 2006. Interference between D and M types of *Plum pox virus* in Japanese plum assessed by specific monoclonal antibodies and quantitative real-time reverse transcription-polymerase chain reaction. *Phytopathology*, 96: 320–325.
- Damsteegt, V. D., Scorza, R., Stone, A. L., Schneider, W. L., Webb, K., Demuth, M. et Gildow, F. E.** 2007. *Prunus* host range of *Plum pox virus* (PPV) in the United States by aphid and graft inoculation. *Plant Disease*, 91: 18–23.

- Damsteegt, V. D., Waterworth, H. E., Mink, G. I., Howell, W. E. et Levy, L.** 1997. *Prunus tomentosa* as a diagnostic host for detection of *Plum pox virus* and other *Prunus* viruses. *Plant Disease*, 81: 329–332.
- Desvignes, J. C.** 1999. *Virus diseases of fruit trees*. Paris, CTIFL, Centr'imprint. 202 pp.
- García, J. A. et Cambra, M.** 2007. *Plum pox virus* and sharka disease. *Plant Viruses*, 1: 69–79.
- Gentit, P.** 2006. Detection of *Plum pox virus*: biological methods. *Bulletin OEPP/EPPO Bulletin*, 36: 251–253.
- James, D. et Glasa, M.** 2006. Causal agent of sharka disease: New and emerging events associated with *Plum pox virus* characterization. *Bulletin OEPP/EPPO Bulletin*, 36: 247–250.
- Karsai, A., Müller, S., Platz, S. et Hauser, M. T.** 2002. Evaluation of a homemade SYBR Green I reaction mixture for real-time PCR quantification of gene expression. *Biotechniques*, 32: 790–796.
- Levy, L. et Hadidi, A.** 1994. A simple and rapid method for processing tissue infected with plum pox potyvirus for use with specific 3' non-coding region RT-PCR assays. *Bulletin OEPP/EPPO Bulletin*, 24: 595–604.
- Myrta, A., Potere, O., Boscia, D., Candresse, T., Cambra, M. et Savino, V.** 1998. Production of a monoclonal antibody specific to the El Amar strain of plum pox virus. *Acta Virologica*, 42: 248–250.
- Myrta, A., Potere, O., Crescenzi, A., Nuzzaci, M. et Boscia, D.** 2000. Production of two monoclonal antibodies specific to cherry strain of plum pox virus (PPV-C). *Journal of Plant Pathology*, 82 (suppl. 2): 95–103.
- NIMP 27.** 2006. *Protocoles de diagnostic pour les organismes nuisibles réglementés*. Rome, CIPV, FAO.
- NIMP 31.** 2008. *Méthodes d'échantillonnage des envois*. Rome, CIPV, FAO.
- OEPP.** 2004. Diagnostic protocol for regulated pests: *Plum pox potyvirus*. *Bulletin OEPP/EPPO Bulletin*, 34: 247–256.
- OEPP.** 2006. Current status of *Plum pox virus* and sharka disease worldwide. *Bulletin OEPP/EPPO Bulletin*, 36: 205–218.
- Olmos, A., Bertolini, E. et Cambra, M.** 2002. Simultaneous and co-operational amplification (Co-PCR): a new concept for detection of plant viruses. *Journal of Virological Methods*, 106: 51–59.
- Olmos, A., Bertolini, E., Gil, M. et Cambra, M.** 2005. Real-time assay for quantitative detection of non-persistently transmitted *Plum pox virus* RNA targets in single aphids. *Journal of Virological Methods*, 128: 151–155.
- Olmos, A., Cambra, M., Dasi, M. A., Candresse, T., Esteban, O., Gorris, M. T. et Asensio, M.** 1997. Simultaneous detection and typing of plum pox potyvirus (PPV) isolates by heminested-PCR and PCR-ELISA. *Journal of Virological Methods*, 68: 127–137.
- Olmos, A., Capote, N., Bertolini, E. et Cambra, M.** 2007. Molecular diagnostic methods for plant viruses. Z. K. Punja, S. DeBoer et H. Sanfacon (sous la direction de). *Biotechnology and plant disease management*, pp. 227–249. Wallingford (Royaume-Uni) et Cambridge (États-Unis), CAB International. 574 pp.
- Osman, F. et Rowhani, A.** 2006. Application of a spotting sample preparation technique for the detection of pathogens in woody plants by RT-PCR and real-time PCR (TaqMan). *Journal of Virological Methods*, 133: 130–136.
- PaDIL.** 2011. <http://old.padil.gov.au/pbt/>, document consulté le 26 octobre 2011.
- Schneider, W. L., Sherman, D. J., Stone, A. L., Damsteegt, V. D. et Frederick, R. D.** 2004. Specific detection and quantification of *Plum pox virus* by real-time fluorescent reverse transcription-PCR. *Journal of Virological Methods*, 120: 97–105.
- Šubr, Z., Pittnerova, S. et Glasa, M.** 2004. A simplified RT-PCR-based detection of recombinant *Plum pox virus* isolates. *Acta Virologica*, 48: 173–176.

- Ulubaş Serçe, Ç., Candresse, T., Svanella-Dumas, L., Krizbai, L., Gazel, M. et Çağlayan, K.** 2009. Further characterization of a new recombinant group of *Plum pox virus* isolates, PPV-T, found in the Ankara province of Turkey. *Virus Research*, 142: 121–126.
- Varga, A. et James, D.** 2005. Detection and differentiation of *Plum pox virus* using real-time multiplex PCR with SYBR Green and melting curve analysis: a rapid method for strain typing. *Journal of Virological Methods*, 123: 213–220.
- Varga, A. et James, D.** 2006. Real-time RT-PCR and SYBR Green I melting curve analysis for the identification of *Plum pox virus* strains C, EA, and W: Effect of amplicon size, melt rate, and dye translocation. *Journal of Virological Methods*, 132: 146–153.
- Wetzel, T., Candresse, T., Macquaire, G., Ravelonandro, M. et Dunez, J.** 1992. A highly sensitive immunocapture polymerase chain reaction method for plum pox potyvirus detection. *Journal of Virological Methods*, 39: 27–37.
- Wetzel, T., Candresse, T., Ravelonandro, M. et Dunez, J.** 1991. A polymerase chain reaction assay adapted to plum pox potyvirus detection. *Journal of Virological Methods*, 33: 355–365.