

## Méthode d'analyse en santé des végétaux

RÉFÉRENCE : ANSES/LSV/MA 021 - Version 3

Décembre 2018

# Détection du *Plum pox virus* (PPV), virus de la Sharka, par la technique ELISA sur feuilles et bourgeons de *Prunus* spp. et sur fleurs de pêcher

### Laboratoire de la santé des végétaux

Laboratoire national de référence «Virus de la Sharka (PPV), virus de la pomme de terre et virus sur agrumes »



## Historique de la méthode

Une méthode est mise à jour afin de prendre en compte des modifications.

*Une modification est qualifiée de majeure* lorsqu'elle concerne le processus analytique, le domaine d'application ou des points critiques de la méthode, dont la prise en compte peut modifier les performances de la méthode d'analyse et/ou les résultats. Une modification majeure induit des adaptations. La méthode ainsi modifiée a fait l'objet d'une nouvelle validation, totale ou partielle.

*Une modification est qualifiée de mineure* si elle apporte des précisions utiles ou pratiques, reformule les propos pour les rendre plus clairs ou plus précis, rectifie des erreurs bénignes. Une modification mineure est sans influence sur les performances de la méthode et ne requiert pas une nouvelle validation.

Le tableau ci-dessous récapitule l'historique des versions de la présente méthode, incluant la qualification des modifications.

| Version       | Nature des modifications | Date         | Principales modifications   |
|---------------|--------------------------|--------------|---|
| MOA 021 v1a * |                          | Janvier 2012 | Version initiale  |
| MA 021 v2 **  | Mineures                 | Octobre 2016 | Modifications sans impact sur la mise en œuvre de la méthode et les compétences associées.<br>- Nouvelles règles d'interprétation<br>- Restriction de la méthode à la matrice feuille<br>- Séparation des deux parties A et B de la MOA 021 v1a<br>- Mise au format Anses                                     |
| MA 021 v3***  | Majeures                 |              | - Extension de la méthode aux matrices fleurs et bourgeons<br>- Mise à jour des connaissances bibliographiques associées<br>- Apport de précisions et reformulations concernant notamment :<br>. la réception et la conservation avant et après analyse des échantillons<br>. la préparation des échantillons |

\* La version 1a a fait l'objet d'une consultation de mai 2011 à juillet 2011 notamment auprès des laboratoires agréés français

\*\* La version 2 a fait l'objet d'une consultation du 13 juillet 2016 au 05 août 2016 sur le site internet de l'agence.

\*\*\* La version 3 a fait l'objet d'une consultation du 19 octobre 2018 au 09 novembre 2018 sur le site internet de l'agence.



## Avant-propos

La présente méthode a été initialement développée par l'unité de Bactériologie - Virologie et OGM d'Angers et co-rédigée avec l'unité de Quarantaine de Clermont-Ferrand, unités du laboratoire de la santé des végétaux de l'Anses.

Cette version a été révisée par l'Unité de Quarantaine de Clermont-Ferrand et revue par l'Unité de Coordination de la Référence d'Angers, unités du laboratoire de la santé des végétaux.

### **Anses - Laboratoire la santé des végétaux**

Laboratoire National de Référence « Virus de la Sharka (PPV), virus de la pomme de terre et virus sur agrumes »

Adresse : Anses  
Laboratoire de la Santé des Végétaux  
Unité de Quarantaine  
6, rue Aimé Rudel  
63370 Lempdes

Contact : [clermont.lsv@anses.fr](mailto:clermont.lsv@anses.fr)



## Sommaire

|   |           |
|---|-----------|
| <b>Introduction</b> .....   | <b>5</b>  |
| <b>Avertissements et précautions de sécurité</b> .....            | <b>6</b>  |
| <b>1. Objet et domaine d'application</b> .....                    | <b>7</b>  |
| <b>2. Documents de référence</b> .....                            | <b>7</b>  |
| <b>3. Termes, sigles et définitions</b> .....                     | <b>8</b>  |
| <b>4. Principe de la méthode</b> .....                            | <b>8</b>  |
| <b>5. Réactifs</b> .....  | <b>9</b>  |
| 5.1 Eau.....  | 9         |
| 5.2 Réactifs sérologiques .....                                   | 9         |
| 5.3 Tampons .....   | 9         |
| 5.4 Autres réactifs et consommables.....                          | 10        |
| 5.5 Contrôles et témoins.....                                     | 10        |
| <b>6. Appareillage et matériels</b> .....                         | <b>11</b> |
| 6.1 Broyeur.....  | 11        |
| 6.2 Spectrophotomètre .....                                       | 11        |
| <b>7. Échantillons</b> .....                                      | <b>12</b> |
| 7.1 Conditions d'acceptation des échantillons .....               | 12        |
| 7.2 Conservation des échantillons avant analyse .....             | 12        |
| 7.3 Conservation des échantillons ou reliquats après analyse..... | 12        |
| <b>8. Mode opératoire</b> .....                                   | <b>13</b> |
| 8.1 Préparation des échantillons pour analyse .....               | 13        |
| 8.2 Broyage.....  | 14        |
| 8.3 Déroulement du test sérologique .....                         | 14        |
| <b>9. Résultats</b> .....   | <b>14</b> |
| 9.1 Contrôle de la validité des résultats .....                   | 14        |
| 9.2 Calculs et expression des résultats .....                     | 14        |
| <b>10. Caractéristiques de performance de la méthode</b> .....    | <b>16</b> |
| <b>Annexe</b> .....   | <b>20</b> |
| <b>Bibliographie</b> .....  | <b>21</b> |



## Introduction

La maladie de la Sharka ou variole du prunier, causée par le *Plum pox virus*, affecte les espèces fruitières du genre *Prunus* spp. Les symptômes peuvent apparaître sur les feuilles et les fruits et chez certaines espèces sur les noyaux (abricotier), l'écorce et les fleurs (pêcher). Sur feuilles, ils se traduisent par des taches ou marbrures chlorotiques, des éclaircissements des nervures et des déformations foliaires. Les fruits infectés présentent des taches ou des anneaux chlorotiques ou nécrotiques. Le virus est transmis par greffage et de manière non-persistante par un très grand nombre de pucerons vecteurs (Rimbaud *et al.*, 2015).

Taxonomie du virus :

Espèce : *Plum pox virus* (PPV), Famille : *Potyviridae*, Genre : *Potyvirus*

Nom commun : Sharka, variole du Prunier, Plum Pox

A l'heure actuelle, neuf souches de PPV ont été identifiées sur la base de critères moléculaires (Garcia *et al.*, 2014) : PPV-M (Marcus) (Candresse *et al.*, 1998), PPV-D (Dideron) (Candresse *et al.*, 1998), PPV-C (Cherry) (Kalashyan *et al.*, 1994), PPV-EA (El Amar) (Glasa *et al.*, 2006), PPV-W (Winona) (James and Varga, 2005), PPV-Rec (Recombinant) (Glasa *et al.*, 2002), PPV-T (Turkey) (Ulubas Serce *et al.*, 2009), PPV-CR (Cherry Russian) (Glasa *et al.*, 2013) et le PPV-An (Ancestor) (Palmisano *et al.*, 2012). Une nouvelle souche spécifique sur cerisier (PPV-Tat) a été également récemment identifiée (Chirkov *et al.*, 2016).

Ces souches présentent une distribution géographique et une prévalence très différente.

En France, les souches PPV-D, PPV-M et plus récemment PPV-Rec ont été identifiées (Svanella-Dumas *et al.*, 2015).



## **Avertissements et précautions de sécurité**

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

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

Certains produits utilisés dans cette méthode peuvent présenter un risque pour l'opérateur et/ou pour l'environnement. Il convient de suivre les recommandations du fournisseur pour l'utilisation de ces produits et l'élimination des déchets et de se référer aux fiches de données de sécurité en vigueur.

### **Elimination des matériels susceptibles d'être contaminants :**

Le PPV est un organisme nuisible réglementé (règlement 2016/2031 UE). Il est présent sur la liste A2 de l'OEPP.

Selon la réglementation phytosanitaire en vigueur, le laboratoire doit posséder un agrément de confinement au sens de la directive 2008/61 CE pour pouvoir manipuler ce virus.

Le laboratoire doit mettre en œuvre des mesures prenant en compte ces risques pour garantir la non dissémination de l'organisme nuisible dans l'environnement.

Ainsi, tout fragment de matériel végétal infecté (ou de statut indéterminé) doit être détruit par autoclavage ou autre moyen inactivant les virus.

Les consommables ayant été en contact avec le matériel végétal infecté (ou de statut indéterminé) doivent être autoclavés ou incinérés par le laboratoire ou une société spécialisée (sachets de broyage, tubes, etc...).

Le matériel ayant été en contact avec le végétal infecté (ou de statut indéterminé) doit être désinfecté.



## 1. Objet et domaine d'application

Cette méthode décrit la détection du PPV par la technique ELISA (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay).

Elle doit être utilisée en respectant les recommandations de la méthode générale MOA 008 dans sa version en vigueur (document de référence [1]).

La présente méthode a été validée sur les matrices feuilles et bourgeons de *Prunus* spp. ainsi que sur fleurs de pêcher.

## 2. Documents de référence

- [1] MOA 008 : « Technique ELISA Bactériologie/Virologie »
- [2] Comparaison de méthodes de détection du *Plum pox virus* – virus de la Sharka. Rapport interne LNPV (2010).
- [3] Rapport complémentaire de validation de méthode (Interprétation des résultats) : MA 021 Détection du *Plum pox potyvirus* (PPV), virus de la Sharka, par la technique ELISA sur *Prunus* spp. Anses – Laboratoire de la santé des végétaux (2016).
- [4] Rapport complémentaire de validation de méthode (Seuil de détection, inclusivité, spécificité et sélectivité) MA 021 Détection du *Plum pox potyvirus* (PPV), virus de la Sharka, par la technique ELISA sur *Prunus* spp. Anses – Laboratoire de la santé des végétaux (2016).
- [5] Rapport complémentaire de validation de méthode. Extension aux matrices bourgeons et fleurs MA 021 Détection du *Plum pox virus* (PPV), virus de la Sharka, par la technique ELISA. Anses – Laboratoire de la santé des végétaux (2018).
- [6] OEPP/EPPO, (2004) Protocoles de diagnostic pour les organismes nuisibles réglementés : *Plum pox virus* PM 7/32(1) Bulletin OEPP/EPPO Bulletin. Volume 34, Issue 2, 247 –256.
- [7] OEPP/EPPO, (2015) Normes OEPP / EPPO Standards: PM 7/125 (1) ELISA tests for viruses. Bulletin OEPP/EPPO Bulletin. Volume 45, Issue 3, 445 - 449.
- [8] CIPV/IPPC Protocoles de diagnostic pour les organismes nuisibles réglementés : *Plum pox virus* ISPM 27 : DP 02 Annex 02 (2018).



### 3. Termes, sigles et définitions

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

### 4. Principe de la méthode

La technique ELISA repose sur une interaction antigène – anticorps révélée à l'aide d'une réaction enzymatique de dégradation d'un substrat. L'absorbance du milieu réactionnel, mesurée par spectrophotométrie, est d'autant plus élevée que la concentration en hydrolysats du substrat est importante (cf documents de référence [6], [7] et [8]).

Bien que produisant une valeur chiffrée (absorbance), il s'agit d'une méthode qualitative donnant une réponse présence / absence de l'organisme cible recherché. Dans certains cas, une réponse indéterminée peut être obtenue.

Les échantillons pour lesquels une réponse négative est obtenue sont considérés comme indemnes de la maladie ou contaminés à un niveau trop faible pour être mis en évidence par la méthode. Les échantillons pour lesquels une réponse positive est obtenue sont considérés comme contaminés.

Les échantillons pour lesquels des résultats indéterminés sont obtenus sont des échantillons pour lesquels la sensibilité analytique de la technique ne permet pas de statuer sur la présence ou non du virus.

Tout résultat indéterminé doit être confirmé par une méthode reposant sur un autre principe technique. Par ailleurs, pour diverses raisons liées principalement à la spécificité de situations phytosanitaires régionales, le demandeur d'analyse peut également être amené à demander la confirmation d'un résultat positif ou d'un résultat négatif.

L'analyse de confirmation est réalisée à partir du reliquat de prise d'essai (matériel végétal reçu au laboratoire), à défaut à partir du broyat végétal.





## 5. Réactifs

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

En règle générale, le manipulateur doit veiller (par l'utilisation de produits et consommables certifiés, par le nettoyage, par la stérilisation ou tout autre traitement approprié) à l'absence dans l'eau, produits et consommables utilisés, de contaminants ou de tout autre élément pouvant influencer sur le résultat.

Les recommandations des fournisseurs concernant les conditions de stockage avant utilisation, seront suivies, ainsi que la conservation en cours d'utilisation. A défaut, le laboratoire définira les conditions qu'il jugera satisfaisantes.

### 5.1 Eau

L'eau doit être de qualité « analytique » (i.e. déminéralisée, distillée, osmosée,...) garantissant d'atteindre les critères de performance attendus pour les tests.

### 5.2 Réactifs sérologiques

La présente méthode a été caractérisée et validée initialement avec les réactifs de marque BIOREBA (Reinach, CH) (référence 2016 : gamme 1505 de réactifs ELISA). Les compléments de validation ont été réalisés avec les réactifs de marque AGDIA (Agdia-Biofords, Evry, FR) (référence : gamme SRA 31505 de réactifs ELISA).

D'autres réactifs peuvent être utilisés à condition que leurs performances soient au moins égales à celles des réactifs utilisés pour la validation (cf. § 10 – Caractéristiques de performance de la méthode).

Les réactifs sérologiques sont des réactifs critiques pour les analyses ELISA. Ils doivent faire l'objet de contrôles conformément aux préconisations de la MOA 008.

### 5.3 Tampons

La liste des tampons nécessaires à la mise en œuvre de la méthode est la suivante :

- Tampon de lavage PBS-Tween
- Tampon de coating
- Tampon de blocage (selon fournisseur)
- Tampon de broyage (ou d'extraction)
- Tampon de conjugué
- Tampon de substrat



Les tampons utilisés doivent être ceux préconisés par le fournisseur de réactifs sérologiques. Les tampons de lavage et de substrat pourront être différents de ceux préconisés à condition qu'ils produisent des résultats équivalents.

Conservation :

Pour les tampons commerciaux concentrés ou non : se référer aux recommandations du fournisseur.

Pour les tampons préparés au laboratoire :

- les solutions 1X : 1 mois au réfrigérateur sauf indication contraire ;
- les solutions 1X avec azide de sodium (dilution d'un tampon commercial concentré) : 3 mois au réfrigérateur;
- les solutions stock concentrées : au maximum 6 mois à température ambiante.

Certains tampons (tampons de blocage, certains tampons de broyage) doivent être préparés extemporanément, dans ce cas, il est conseillé de ne pas utiliser le tampon au-delà d'une journée.

#### 5.4 Autres réactifs et consommables

- Plaques de microtitration (et couvercles) : Utiliser des plaques de microtitration à fond plat de type NUNC Immunosorbent Maxisorp certifiées ou de toute autre marque assurant une qualité de réaction au moins équivalente.
- Substrat : à diluer dans du tampon de substrat selon les consignes du fournisseur. Pour un marquage à la phosphatase alcaline (le plus fréquent), le substrat est le p-nitrophényl phosphate (pNPP) ou équivalent.
- Hypochlorite de sodium à 1% de chlore actif (m/v) (ou autre produit équivalent) : désinfection des surfaces de travail et du matériel.

#### 5.5 Contrôles et témoins

Il est obligatoire d'intégrer des références de lecture sur chaque plaque de microtitration. Conformément aux exigences de la MOA 008, ces références sont constituées :

- des témoins sains (TS) : il s'agit de matrices de *Prunus* spp. indemnes de PPV, identiques à celles des échantillons analysés et de la même espèce (pêcher, prunier, abricotier, ...) lorsque celle-ci est connue. Les témoins sains sont traités en parallèle et selon les mêmes conditions que les échantillons à analyser. Ils sont au minimum deux (par exemple : fleurs de deux variétés de pêcher), à raison de deux puits par témoin. Il est recommandé d'utiliser trois témoins sains dans la mesure du possible.

Ces témoins sains serviront à déterminer le seuil de négativité et de positivité.



- des témoins malades (TM) : ils donnent au minimum l'assurance d'un déroulement correct de la manipulation. Pour chaque série d'analyses, on peut soit utiliser des échantillons végétaux contaminés par le PPV préparés au laboratoire (échantillons de référence naturellement ou artificiellement contaminés) soit des témoins commerciaux positifs (lyophilisés, glycérolés...) à préparer selon les recommandations du fournisseur. Deux puits minimum sont à utiliser.
- des témoins tampons (TP) : Il s'agit d'un essai blanc constitué uniquement du tampon de broyage pour le contrôle du bruit de fond sur le tampon de broyage. Deux puits minimum sont à utiliser.
- des témoins substrat (appelés également puits substrat) : il s'agit d'un contrôle du bruit de fond généré par le substrat seul. Deux puits minimum sont à utiliser. Chaque puits est rempli d'eau de qualité analytique à chaque étape de dépôt, excepté à la dernière étape où ils sont remplis de la solution de substrat.

L'utilisation de ces références sert à valider le bon déroulement des différentes étapes de l'analyse ainsi que les résultats obtenus sur les différentes microplaques.

## 6. Appareillage et matériels

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

Pour la mise en œuvre de cette méthode, le laboratoire disposera des appareils décrits dans la MOA 008.

Les considérations d'ordre métrologique à appliquer sont celles de la MOA 008 en vigueur.

### 6.1 Broyeur

Broyeur à billes type Homex 6 (Bioreba) ou équivalent.

### 6.2 Spectrophotomètre

La méthode a été caractérisée et validée sur un spectrophotomètre capable d'enregistrer des absorbances à la longueur d'onde de 405 nm correspondante au substrat pNPP. Tout spectrophotomètre adapté techniquement et métrologiquement à la lecture de microplaques ELISA à la longueur d'onde adaptée au substrat peut être utilisé.



## 7. Échantillons

### 7.1 Conditions d'acceptation des échantillons

Les échantillons reçus pour analyse doivent être constitués d'un minimum de 1,00 g de feuilles ou de fleurs, ou de 0,50 g de bourgeons.

Les échantillons reçus pour analyse doivent être dans un bon état de conservation, c'est-à-dire, ni desséchés, ni nécrosés ni en cours de décomposition.

Dans les cas contraires, le laboratoire émet des réserves à réception en cas d'obtention de résultat négatif, en précisant la raison (masse insuffisante, état de conservation peu satisfaisant mais acceptable).

Si les échantillons arrivent dans un état trop dégradé ou si la masse reçue ne permet pas de mettre en œuvre la méthode ou dans d'autres cas dûment justifiés, le laboratoire peut refuser l'analyse. Le refus d'analyse doit être motivé et notifié au client dans les plus brefs délais.

### 7.2 Conservation des échantillons avant analyse

A réception, les échantillons peuvent être conservés au réfrigérateur pendant une semaine maximum en attente de préparation.

Les échantillons préparés pour analyse (feuilles et fleurs découpées et/ou pesées, ou bourgeons prélevés du rameau et/ou pesés) doivent être conservés au congélateur (froid intense de préférence) pendant 1 mois maximum.

### 7.3 Conservation des échantillons ou reliquats après analyse

Les laboratoires doivent conserver les reliquats pertinents (nature, quantité et qualité) de matériel soumis à analyse, dans des conditions appropriées garantissant leur intégrité (cf 7.2 et 8.2), jusqu'à au moins le quinzième jour calendaire suivant l'envoi au demandeur du rapport d'analyse. Dans le cas d'un résultat positif ou indéterminé, ce délai est prolongé à 12 mois pour les reliquats qui le permettent.

Ce délai imposé est destiné à laisser le temps au demandeur de l'analyse de contester le résultat auprès du laboratoire (ce qui prolonge la conservation du reliquat jusqu'à l'issue de la contestation) et éventuellement de demander une analyse contradictoire ou une analyse de confirmation.

Les conditions de transport des reliquats devront être en adéquation avec le mode de conservation antécédent (transport à l'état réfrigéré d'un reliquat conservé au réfrigérateur, transport à l'état congelé d'un reliquat conservé au congélateur). Les reliquats peuvent avoir été préparés pour analyse (cf 8.1) ou être constitués de broyats (cf 8.2) et, dans ces cas, ils devront être transportés à l'état congelé.



## 8. Mode opératoire

L'utilisateur opérera selon une procédure adaptée à son contexte (infrastructures, organisation) qui vise à éviter tout risque de confusion entre échantillons ou de contamination d'un échantillon par un autre. L'utilisateur veillera à désinfecter (cf § 5.4) le matériel utilisé ainsi que les surfaces de travail.

### 8.1 Préparation des échantillons pour analyse

La prise d'essai pour une analyse par ELISA est de 1,00 g pour les feuilles et fleurs et 0,50 g pour les bourgeons.

#### Préparation des feuilles :

La prise d'essai est constituée de la partie basale (partie qui doit être privilégiée) de chaque feuille de l'échantillon.

La préparation peut être réalisée comme suit :

- Superposition des feuilles reçues par rapport à la partie basale
- Elimination des pétioles
- Découpe du limbe pour obtenir la même surface pour chacune des feuilles reçues
- Découpe de la partie basale des feuilles, perpendiculairement à la nervure centrale, jusqu'à l'obtention de la masse requise

#### Préparation des fleurs :

La fleur entière constitue la matrice soumise à analyse et ne nécessite pas de préparation particulière. Si l'échantillon est constitué de plus de 1,00 g de fleurs, il convient de découper un fragment de chaque fleur, de manière la plus représentative possible, jusqu'à l'obtention de la masse requise.

#### Préparation des bourgeons :

Le bourgeon entier constitue la matrice soumise à analyse et ne nécessite pas de préparation particulière. Si l'échantillon est constitué de plusieurs rameaux, il convient de prélever des bourgeons de chaque rameau, de manière la plus représentative possible, jusqu'à l'obtention de la masse requise.

Les bourgeons issus des rameaux peuvent être prélevés avec un scalpel.

La conservation des échantillons préparés pour analyse (sous forme découpée ou prélevées (bourgeons)) étant très limitée à température ambiante, il faudra donc veiller à maintenir les échantillons au réfrigérateur et procéder rapidement au broyage (dans la demi-journée). Dans le cas contraire, il est nécessaire de procéder à la congélation des échantillons préparés et de les conserver au congélateur (froid intense de préférence) pendant 1 mois au maximum.



## 8.2 Broyage

Le matériel végétal est placé dans un sachet à filtre et broyé dans le tampon de broyage préconisé par le fournisseur de réactifs sérologiques et selon le ratio masse/volume préconisé par le fournisseur (généralement 1/10, soit par exemple 1,0 g de matériel végétal frais pour 10,0 mL de tampon), à l'aide d'un broyeur à billes, ou de toute autre méthode de broyage permettant d'obtenir des résultats équivalents.

Les broyats obtenus doivent être conservés au réfrigérateur et utilisés le plus vite possible (au plus tard dans la demi-journée). S'ils constituent le seul reliquat d'analyse disponible, les broyats sont conservés au congélateur selon les modalités indiquées au paragraphe 7.3.

## 8.3 Déroulement du test sérologique

Établir soigneusement le plan de distribution (plan de plaque) et d'identification des extraits (voir exemple en annexe 1). Chaque échantillon (prise d'analyse) est au moins répété 1 fois soit 2 puits par échantillon.

Le protocole d'analyse du fournisseur de réactifs sérologiques doit être suivi en priorité (étapes, durées et températures d'incubation, volumes, dilutions).

Si nécessaire, se référer aux recommandations de la MOA 008 concernant le déroulement du test.

La lecture de référence utilisée pour calculer les seuils et interpréter les résultats est effectuée à 2h d'incubation du substrat.

## 9. Résultats

### 9.1 Contrôle de la validité des résultats

L'observation et conformité à l'attendu des résultats obtenus sur les témoins décrits au § 5.5 sont un préalable à l'interprétation des résultats obtenus sur les échantillons soumis à analyse. Les résultats des échantillons soumis à analyse ne sont interprétables qu'à partir du moment où tous les critères de validation des microplaques présentés dans la MOA 008 sont vérifiés.

### 9.2 Calculs et expression des résultats

#### Calcul des seuils

Quelle que soit la matrice, l'interprétation des résultats est réalisée sur la base du calcul de deux seuils, notés S1 et S2.

Seuil de négativité :  $S1 = \text{« Moyenne absorbances brutes des TS »} \times 1,3$

Seuil de positivité :  $S2 = \text{« Moyenne absorbances brutes des TS »} \times 2,3$



Pour chaque échantillon, on considère la moyenne d'absorbance brute des 2 puits. Cette moyenne est comparée aux seuils S1 et S2.

#### Expression des résultats

L'analyse est qualitative, trois catégories de résultats sont définies : positif, indéterminé, négatif.

**Positif :** La moyenne des valeurs de l'absorbance de l'échantillon est supérieure ou égale à S2.

Le résultat peut être formulé de la façon suivante : *Plum pox virus* détecté dans l'échantillon analysé.

**Indéterminé :** La moyenne des valeurs de l'absorbance de l'échantillon est comprise dans l'intervalle [S1 ; S2].

Le résultat peut être formulé de la façon suivante : Résultat indéterminé concernant la détection du *Plum pox virus* pour l'échantillon analysé.

**Négatif :** La moyenne des valeurs de l'absorbance de l'échantillon est inférieure à S1.

Le résultat peut être formulé de la façon suivante : *Plum pox virus* non détecté dans l'échantillon analysé.



## 10. Caractéristiques de performance de la méthode

Les caractéristiques de performances de la méthode ont dans un premier temps été évaluées sur la matrice feuilles. (Rapports de validation initiaux (documents de référence [2]).

| Caractéristique    | Paramètre   | Valeur ou résultat obtenu lors de la caractérisation | Principales informations relatives aux modalités de réalisation de la caractérisation   |
|--------------------|---|--|---|
| Sensibilité        | Pourcentage d'échantillons détectés parmi les échantillons cibles   | 100%   | 10 échantillons cibles constitués de :<br>-5 échantillons de terrain (pêchers et pruniers) reconnus contaminés par le PPV<br>-2 isolats de PPV souche D sur pêcher<br>-2 isolats de PPV souche M sur pêcher<br>-1 isolat de PPV souche Rec sur prunier<br>Les échantillons ont été testés en 3 réplicats à raison de deux puits par réplicat.   |
| Spécificité        | Pourcentage d'échantillons non détectés parmi les échantillons non-cibles                                       | 100%   | 10 échantillons non cibles constitués de :<br>-4 échantillons de terrain (pêchers et pruniers) reconnus indemnes de PPV<br>-6 échantillons contaminés par les virus : <i>Prunus necrotic ringspot virus</i> (PNRSV), <i>Prune dwarf virus</i> (PDV), <i>Tomato ringspot virus</i> (ToRSV), <i>Potato virus Y</i> (PVY), <i>Asian prunus virus</i> (PLV), <i>Apple chlorotic leaf spot virus</i> (ACLSV).<br>Les échantillons ont été testés en 3 réplicats à raison de deux puits par réplicat. |
| Exactitude         | Pourcentage de vrais positifs et de vrais négatifs parmi des échantillons cibles et des échantillons non-cibles | 100%   | L'exactitude a été calculée à l'aide de l'ensemble des résultats obtenus lors de l'évaluation de la sensibilité et de la spécificité.   |
| Seuil de détection | Niveau de dilution le plus faible pour lequel 100% des résultats sont positifs                                  | Dilution 1/20  | 2 gammes de dilutions décimales ont été constituées à partir de 2 échantillons de prunier de terrain contaminés par le PPV (souche non connue)<br>Chaque niveau de dilution a été testé en 3 réplicats à raison de deux puits par réplicat.   |
| Répétabilité       | Pourcentage d'accords entre résultats pour les mêmes échantillons   | 100%   | La répétabilité a été calculée à l'aide de l'ensemble des résultats obtenus lors de l'évaluation de la sensibilité et de la spécificité.  |





Les rapports de validation complémentaire (documents de référence [3] et [4]) ont permis de compléter les données de performance de la méthode.

| Caractéristique           | Paramètre   | Valeur ou résultat obtenu lors de la caractérisation | Principales informations relatives aux modalités de réalisation de la caractérisation   |
|---------------------------|---|--|---|
| Sensibilité (Inclusivité) | Pourcentage d'échantillons détectés parmi les échantillons cibles           | 100 %  | Neuf échantillons cibles constitués de :<br>-1 isolat de PPV souche M<br>-1 isolat de PPV souche D<br>-1 isolat de PPV souche Rec<br>-1 isolat de PPV souche C<br>-1 isolat de PPV souche EA<br>-1 isolat de PPV souche T<br>-1 isolat de PPV souche CR<br>-1 isolat de PPV souche W<br>-1 isolat de PPV souche An<br>Les échantillons ont été testés en 10 réplicats ou 6 réplicats (souche C et An) à raison de 2 puits par réplicat.   |
| Spécificité               | Pourcentage d'échantillons non détectés parmi les échantillons non - cibles | 100 %  | Douze échantillons non cibles constitués de :<br>-6 échantillons d'espèces de Prunus ou d'hybrides de Prunus reconnus indemnes de PPV<br>- <i>Prunus persica</i> (pêcher cv. GF 305)<br>- <i>Prunus armeniaca</i> (abricotier cv. Manicot)<br>- <i>Prunus domestica</i> (prunier domestique cv. Ente)<br>- <i>Prunus persica</i> x <i>Prunus davidiana</i> (hybride de pêcher cv. Cadaman)<br>- <i>Prunus mahaleb</i> x <i>Prunus avium</i> (hybride de cerisier cv. MM14)<br>- <i>Prunus salicina</i> x <i>Prunus spinosa</i> (hybride de prunier cv. Jaspi)<br><br>-6 échantillons contaminés par les virus :<br><i>Apple chlorotic leaf spot virus (ACLSV)</i><br><i>Apricot latent ringspot virus (ALRSV)</i><br><i>American plum line pattern virus (APLPV)</i><br><i>Little cherry virus 2 (LChV2)</i><br><i>Peach mosaic virus (PcMV)</i><br><i>Tomato ringspot virus (ToRSV)</i><br>Les échantillons ont été testés en 6 réplicats à raison de deux puits par réplicat. |
| Sélectivité               | Pourcentage d'échantillons détectés parmi les échantillons non cibles dopés | 83%  | Six espèces de prunus ou d'hybrides de prunus indemnes de PPV ont été testées. Chaque broyat de feuilles a été dopé par du broyat de feuille contaminée par le PPV de manière à obtenir deux niveaux de contamination (un très proche du seuil de détection de la méthode et l'autre correspondant à une concentration double)<br>- <i>Prunus persica</i> (pêcher cv. GF 305)<br>- <i>Prunus armeniaca</i> (abricotier cv. Manicot)<br>- <i>Prunus domestica</i> (prunier domestique cv. Ente)<br>- <i>Prunus persica</i> x <i>Prunus davidiana</i> (hybride de   |



|                    |  |  |  |
|--------------------|--|--|--|
|                    |  |  | <p>pêcher cv. Cadaman)<br/>         -<i>Prunus mahaleb</i> x <i>Prunus avium</i> (hybride de cerisier cv. MM14)<br/>         -<i>Prunus salicina</i> x <i>Prunus spinosa</i> (hybride de prunier cv. Jaspi)<br/>         Les échantillons ont été testés en 6 réplicats à raison de deux puits par réplicat.<br/>         Le PPV n'a pas été détecté dans le cas du dopage avec l'espèce <i>Prunus armeniaca</i> (abricotier cv. Manicot) aux deux concentrations testées.</p>   |
| Seuil de détection | Niveau de dilution le plus faible pour lequel 100% des résultats sont positifs | Entre les dilutions 1/200 et 1/1000 selon les échantillons | <p>Trois gammes de dilutions décimales ont été constituées à partir de trois échantillons de feuilles de prunus contaminés chacun par une souche différente du PPV parmi les souches D, M et Rec par dilution des broyats dans du broyat de <i>Prunus persica</i> (pêcher cv. GF 305)<br/>         Les niveaux de dilution testés sont les suivants :<br/>         1/10 – 1/20 – 1/50 – 1/100 – 1/200 – 1/500 – 1/1000 – 1/2000 – 1/5000<br/>         Chaque niveau de dilution pour chacune des souches a été testé en 6 réplicats à raison de deux puits par réplicat.</p> |

Le rapport de validation complémentaire (document de référence [5]) a permis de compléter les données de performance de la méthode concernant les matrices fleurs et bourgeons.

| Caractéristique                | Paramètre   | Valeur ou résultat obtenu lors de la caractérisation | Principales informations relatives aux modalités de réalisation de la caractérisation   |
|--------------------------------|---|--|---|
| Spécificité "bourgeons"        | Pourcentage d'échantillons non détectés parmi les échantillons non - cibles | 100 %  | <p>22 échantillons non cibles constitués de bourgeons issus de différents plants d'espèces de prunus ou d'hybrides de prunus reconnus indemnes de PPV</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- 5 plants de <i>Prunus persica</i> (pêcher cv. GF 305)</li> <li>- 4 plants de <i>Prunus persica</i> (pêcher cv. Monclar)</li> <li>- 2 plants de <i>Prunus armeniaca</i> (abricotier cv. Manicot)</li> <li>- 1 plant de <i>Prunus domestica</i> (prunier domestique cv. Ente)</li> <li>- 1 plant de <i>Prunus persica</i> x <i>Prunus davidiana</i> (hybride de pêcher cv. Cadaman)</li> <li>- 3 plants de <i>Prunus mahaleb</i> x <i>Prunus avium</i> (hybride de cerisier cv. MM14)</li> <li>- 5 plants de <i>Prunus salicina</i> x <i>Prunus spinosa</i> (hybride de prunier cv. Jaspi)</li> <li>- 1 plant de <i>Prunus avium</i> x <i>Prunus pseudocerasus</i> (cerisier cv. Colt)</li> </ul> <p>Les échantillons ont été testés en 6 réplicats à raison de un puits par réplicat.</p> |
| Seuil de détection "bourgeons" | Niveau de dilution le plus faible pour lequel 100% des                      | Entre les dilutions 1/20 et 1/500 selon les          | <p>Trois gammes de dilutions décimales ont été constituées à partir de trois échantillons de bourgeons de prunus contaminés chacun par les souches D, M et Rec du PPV et par dilution des broyats dans du</p>   |



|                           |   |   |  |
|---------------------------|---|---|--|
|                           | résultats sont positifs   | échantillons  | <p>broyat de bourgeons de <i>Prunus persica</i> (pêcher cv. GF 305)</p> <p>Les niveaux de dilution testés sont les suivants :<br/>1/10 – 1/20 – 1/50 – 1/100 – 1/200 – 1/500 – 1/1000 – 1/2000 – 1/5000</p> <p>Chaque niveau de dilution pour chacune des souches a été testé en 6 réplicats à raison de un puits par réplicat.</p>  |
| Sélectivité « bourgeons » | Pourcentage d'échantillons détectés parmi les échantillons non cibles dopés | <p>50% au seuil de détection</p> <p>100% au double du seuil de détection</p>  | <p>Quatre espèces de prunus ou d'hybrides de prunus indemnes de PPV ont été testées. Chaque broyat de bourgeons a été dopé par du broyat de feuille contaminée par le PPV de manière à obtenir deux niveaux de contamination (un au seuil de détection de la méthode et l'autre correspondant à une concentration double)</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>-<i>Prunus armeniaca</i> (abricotier cv. Manicot)</li> <li>-<i>Prunus domestica</i> (prunier domestique cv. Ente)</li> <li>-<i>Prunus mahaleb</i> x <i>Prunus avium</i> (hybride de cerisier cv. MM14)</li> <li>-<i>Prunus salicina</i> x <i>Prunus spinosa</i> (hybride de prunier cv. Jaspi)</li> </ul> <p>Les échantillons ont été testés en 6 réplicats à raison de un puits par réplicat.</p> <p>Le PPV n'a pas été détecté dans le cas du dopage avec l'espèce <i>Prunus armeniaca</i> (abricotier cv. Manicot) et l'espèce <i>Prunus mahaleb</i> x <i>Prunus avium</i> (hybride de cerisier cv. MM14) au seuil de détection.</p> |
| Spécificité "fleurs"      | Pourcentage d'échantillons non détectés parmi les échantillons non - cibles | 100 %   | <p>11 échantillons non cibles constitués de fleurs de différents plants de pêchers de cultivars différents et reconnus indemnes de PPV ont été testés :</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- 3 plants de <i>Prunus persica</i> (pêcher cv. GF 305)</li> <li>- 1 plant de <i>Prunus persica</i> (pêcher cv. GF 677)</li> <li>- 5 plants de <i>Prunus persica</i> (pêcher cv. Montclar)</li> <li>- 1 plant de pêcher (cultivar inconnu)</li> <li>- 1 plant de <i>Prunus persica</i> x <i>Prunus davidiana</i> (hybride de pêcher cv. Cadaman)</li> </ul> <p>Les échantillons ont été testés en 6 réplicats à raison de deux puits par réplicat.</p>  |
| Sélectivité « fleurs »    | Pourcentage d'échantillons détectés parmi les échantillons non cibles dopés | <p>100% au seuil de détection</p> <p>100% au double du seuil de détection</p> | <p>Trois cultivars de pêchers reconnus indemnes de PPV ont été testés. Chaque broyat de fleurs a été dopé par du broyat de feuille contaminée par le PPV de manière à obtenir deux niveaux de contamination (le seuil de détection de la méthode et l'autre correspondant à une concentration double)</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- <i>Prunus persica</i> (pêcher cv. GF 305)</li> <li>- <i>Prunus persica</i> (pêcher cv. Montclar)</li> <li>- <i>Prunus persica</i> x <i>Prunus davidiana</i> (hybride de pêcher cv. Cadaman)</li> </ul> <p>Les échantillons ont été testés en 6 réplicats à raison de un puits par réplicat.</p>   |



## Annexe

### Exemple de plan de plaque

|   | 1   | 2              | 3   | 4   | 5   | 6   | 7   | 8   | 9   | 10  | 11  | 12  |
|---|-----|----------------|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| A | eau | eau            | eau | eau | eau | eau | eau | eau | eau | eau | eau | eau |
| B | eau | substrat*      |     |     |     | TS2 |     |     |     |     |     | eau |
| C | eau | substrat*      |     |     |     | TS2 |     |     |     |     |     | eau |
| D | eau | Ech 1<br>Rep 1 | TS1 |     |     |     |     |     |     |     | TP  | eau |
| E | eau | Ech 1<br>Rep 2 | TS1 |     |     |     |     |     |     |     | TP  | eau |
| F | eau | Ech 2<br>Rep 1 |     |     |     |     |     |     |     | TS3 | TM  | eau |
| G | eau | Ech 2<br>Rep 2 |     |     |     |     |     |     |     | TS3 | TM  | eau |
| H | eau | eau            | eau | eau | eau | eau | eau | eau | eau | eau | eau | eau |

\*eau sauf à la dernière étape où l'eau est remplacée par du substrat

#### Observations :

Les extraits sont doublés verticalement.

Les lignes et colonnes de bordure sont remplies avec de l'eau à toutes les étapes. Le tour d'eau n'est pas obligatoire si le système de couverture de la microplaque est étanche et que le laboratoire peut prouver qu'il n'y a pas d'effet de bordure.



## Bibliographie

- Candresse, T., Cambra, M., Dallot, S., Lanneau, M., Asensio, M., Gorris, M. T., Revers, F., Macquaire, G., Olmos, A., Boscia, D., Quiot, J. B., and Dunez, J.** (1998). Comparison of monoclonal antibodies and polymerase chain reaction assays for the typing of isolates belonging to the D and M serotypes of *Plum pox potyvirus*. *Phytopathology* **88**:198-204.
- Candresse, T. and 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.
- Chirkov, S., Ivanov, P., Sheveleva, A., Zakubanskiy, A. and Osipov, G.** (2016). New highly divergent Plum pox virus isolates infecting sour cherry in Russia. *Virology*, 502: 56–62.
- Garcia, J.A., Glasa, M., Cambra, M. and Candresse, T.** (2014) *Plum pox virus* and sharka: a model potyvirus and a major disease. (2014) *Molecular Plant Pathology* **15**(3): 226-241.
- Glasa, M., MarieJeanne, V., Labonne, G., Subr, Z., Kudela, O. and Quiot, J.B.** (2002) A natural population of recombinant *Plum pox virus* is viable and competitive under field conditions. *Eur. J. Plant Pathol.* **108**: 843-853.
- Glasa, M., Svanella, L. and Candresse, T.** (2006) The complete nucleotide sequence of the *Plum pox virus* El Amar isolate. *Arch. Virol.* **151**: 1679-1682.
- Glasa, M., Prikhodko, Y., Predajna, L., Pupola, N., Dekena, D., Michalczyk, L. and Candresse, T.** (2013) Characterization of sour cherry isolates of *Plum pox virus* from the Volga basin in Russia reveals a new cherry strain of the virus. *Phytopathology* **103**: 972-979.
- Grosdidier, M., Aguayo, J., Marçais, B. and Ios, R.** (2017) Detection of plant pathogens using real-time PCR: how reliable are late Ct values? *Plant Pathology* **66**, 359–367.
- James, D. and 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.
- James, D. and Varga, A.** (2005) Nucleotide sequence analysis of *Plum pox virus* isolate W3174: evidence of a new strain. *Virus. Res.* **110**: 143-150.
- Kalashyan, Y.A., Bilkey, N.D., Verderevskaya, T.D. and Rubina, E.V.** (1994) *Plum pox virus* on sour cherry in Moldava. *EPPO Bull.* **24**: 645-649.
- Olmos, A., Bertolini, E., Gil, M., Cambra, M.,** (2005). Real-time assay for quantitative detection of non-persistently transmitted Plum Pox potyvirus RNA targets in single aphids. *Journal of Virological Methods.* **128**: 151-155.
- Palmisano, F., Boscia, D., Minafra, A., Myrta, A. and Candresse, T.** (2012) An atypical Albanian isolate of *Plum pox virus* could be the progenitor of the Marcus strain. In: *22<sup>nd</sup> International Conference on Virus and Other Graft transmissible Diseases of Fruit Crops, June 3-8, Rome, Book of Abstracts, p33.*
- Rimbaud, L., Dallot, S., Gottwald, T., Decroocq, V., Jacquot, E., Soubeyrand, S., Thebaud, G.** (2015). Sharka epidemiology and worldwide management strategies: learning lessons to optimize disease control in perennial plants. *Annual Review of Phytopathology* **53**:357-378.
- Roenhorst, J. W., Jansen, C. C. C., Kox, L. F. F., de Haan, E. G., van den Bovenkamp, G. W., Boonham, N., Fisher, T., and Mumford, R. A.** (2005). Application of real-time RT-PCR for largescale testing of potato for Potato spindle tuber pospiviroid. *Bulletin OEPP/EPPO Bulletin* **35**: 133-140.
- Svanella-Dumas, L., Candresse, T.** (2015). First Report of the Presence of *Plum pox virus* Rec Strain in France. *Plant disease* **99**: 421.
- Ulubaş Serçe, Ç., Candresse, T., Svanella-Dumas, L., Krizbai, L., Gazel, M. and 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