

Méthode d'analyse en santé des végétaux

RÉFÉRENCE : ANSES/LSV/MA 043 - Version 2

Décembre 2018

Détection du *Plum pox virus* (PPV), virus de la Sharka, par la technique RT – PCR en temps réel 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 (majeure/mineure)	Date	Principales modifications
MOA 021 v1a *		Janvier 2012	Version initiale
MA 043 v1	Mineures	Septembre 2016	<ul style="list-style-type: none">- Modifications sans impact sur la mise en œuvre de la méthode et les compétences associées- Introduction d'un nouveau témoin en cours d'analyse- Correction d'une erreur concernant l'interprétation d'un témoin d'analyse- Séparation des deux parties A et B de la MOA 021v1a- Mise au format Anses
MA 043 v2	Majeures	Décembre 2018	<ul style="list-style-type: none">- Extension de la méthode aux matrices « bourgeons de <i>Prunus</i> spp. et fleurs de pêcher »- Possibilité d'utiliser une extraction alternative pour la matrice « feuille de <i>Prunus</i> spp. »- Mise à jour des connaissances bibliographiques associées- Apport de précisions et reformulations concernant :<ul style="list-style-type: none">. la réception, conservation avant et après analyse des échantillons. les contrôles et témoins. le contrôle de la validité des résultats et leur interprétation. la forme du DIECA utilisé

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



Avant-propos

La présente méthode a été 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 puis relue par l'équipe Epidémiologie et Vecton, Unité Mixte de Recherche - Biologie et Génétique des Interactions Plante-Parasite, de l'Institut National de la Recherche Agronomique (INRA) de Montpellier et par l'Unité de Coordination de la Référence d'Angers, unité du Laboratoire de la Santé des Végétaux de l'Anses.

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



Sommaire

Introduction	6
Avertissements et précautions de sécurité	7
1. Objet et domaine d'application	8
2. Documents de référence	8
3. Termes, sigles et définitions	8
4. Principe de la méthode	9
5. Réactifs	9
5.1 Eau.....	10
5.2 Réactifs d'extraction d'acides nucléiques	10
5.3 Réactifs de RT-PCR en temps réel.....	10
5.4 Autres réactifs et consommables à usage unique.....	11
5.5 Contrôles et témoins.....	12
6. Appareillage et matériels	13
6.1 Préparation des échantillons et broyage	13
6.2 Extraction des acides nucléiques.....	13
6.3 RT-PCR.....	14
7. Échantillons	14
7.1 Conditions d'acceptation des échantillons	14
7.2 Conservation des échantillons avant analyse	14
7.3 Conservation des échantillons ou reliquats après analyse.....	15
8. Mode opératoire	15
8.1 Préparation des échantillons pour analyse	15
8.2 Broyage.....	16
8.3 Extraction des acides nucléiques.....	16
8.3.1 Extraction des ARN avec le RNeasy plant mini kit.....	17
8.3.2 Extraction des acides nucléiques avec le QuickPick SML Plant DNA.....	18
8.3.3 Conservation des extraits.....	19
8.4 RT-PCR en temps réel	19
9. Résultats	20
9.1 Contrôle de la validité des résultats	20



9.2 Calculs et expression des résultats	22
9.2.1 Interprétation des résultats.....	22
9.2.2 Formulation du résultat d'analyse	23
10. Caractéristiques de performance de la méthode.....	24
Annexe 1 : Tampon d'extraction PBS-PVP10-DIECA	29
Annexe 2 : Programme d'extraction de l'automate KingFisher™ ML	30
Bibliographie.....	33



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 par le 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 RT - PCR en temps réel.

Elle doit être utilisée en respectant les recommandations de la méthode générale MOA 022 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 022 : Techniques qualitatives d'amplification enzymatique des acides nucléiques : PCR (Polymerase Chain Reaction), RT-PCR (Reverse Transcription-PCR) et PCR temps réel. Détection et identification des organismes phytopathogènes.
- [2] Comparaison de méthodes de détection du *Plum pox virus* – virus de la Sharka. Rapport interne LNPV (2010).
- [3] Rapport complémentaire Reproductibilité – Méthode de détection du PPV par RT-PCR temps réel (Olmos *et al.*, 2005) (2011).
- [4] Rapport complémentaire de validation de méthode (Inclusivité et sélectivité) – Méthode de détection du PPV par RT-PCR temps réel (Olmos *et al.*, 2005) (2016).
- [5] Rapport complémentaire de validation de méthode MA 043. Extension aux matrices bourgeons de *Prunus* spp. et fleurs de pêcher. Détection du *Plum pox virus* (PPV), virus de la Sharka, par la technique RT-PCR en temps réel (2018).
- [6] Rapport de validation de technique d'extraction alternative des virus des arbres fruitiers. Anses – Laboratoire de la Santé des Végétaux (2018).
- [7] CIPV / IPPC Protocoles de diagnostic pour les organismes nuisibles réglementés : *Plum pox virus* ISPM 27 : DP 02 Annex 02 (2012).

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 méthode comporte les étapes suivantes :

- Extraction des acides nucléiques à partir de matrices de *Prunus* spp.,
- Rétro-transcription (RT),
- PCR temps réel spécifique du PPV.

Les réactions de RT et de PCR en temps réel sont réalisées à la suite dans un même mix réactionnel (protocole « one-step »).

La spécificité de l'amplification est assurée à la fois par trois amorces permettant l'amplification d'une région caractéristique du génome viral et par une sonde de type Taqman. Au cours de l'amplification de la région spécifique, la sonde est lysée ce qui génère un signal de fluorescence détecté par le thermocycleur en temps réel.

Bien que produisant une valeur chiffrée (Ct), il s'agit d'une méthode qualitative donnant une réponse présence / absence du virus.

Les échantillons pour lesquels une réponse négative est obtenue sont considérés comme indemnes du virus ou contaminés à un niveau trop faible pour être détectés par la méthode. Les échantillons pour lesquels une réponse positive est obtenue sont considérés comme contaminés.

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 contaminant (acides nucléiques), de nucléase, d'inhibiteur 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 optimales.



5.1 Eau

Une eau déminéralisée de qualité « ultra-pure » peut être utilisée pour la préparation du tampon d'extraction sous réserve qu'elle présente une qualité suffisante. L'eau utilisée à toutes les autres étapes de la méthode doit être de qualité « biologie moléculaire » garantissant l'absence d'acides nucléiques, de nucléases et d'inhibiteurs.

5.2 Réactifs d'extraction d'acides nucléiques

Le tampon d'extraction utilisé est un tampon PBS-PVP10-DIECA (composition présentée en annexe 1).

Les acides nucléiques des échantillons à analyser sont extraits et purifiés :

- soit manuellement à l'aide d'un kit d'extraction d'ARN de plante de type « colonne » : RNeasy Plant mini Kit (Qiagen, Venlo, Pays-Bas),
- soit de manière automatisée à l'aide d'un kit d'extraction des acides nucléiques de plante utilisant des billes magnétiques : QuickPick SML Plant DNA (Bio-Nobile, Pargas, Finlande).

L'utilisation des kits d'extraction dépend de la matrice concernée :

- RNeasy Plant mini Kit : utilisation validée pour toutes les matrices analysables de la méthode,
- QuickPick SML Plant DNA : utilisation validée pour la matrice « feuille » uniquement.

5.3 Réactifs de RT-PCR en temps réel

Oligonucléotides

L'amplification spécifique du fragment cible de 76 pb nécessite l'utilisation des amorces suivantes (Olmos *et al.*, 2005) citées dans le document de référence [7].

- P241 : 5'-CGT TTA TTT GGC TTG GAT GGA A-3'
- P316D : 5'-GAT TAA CAT CAC CAG CGG TGT G-3'
- P316M : 5'-GAT TCA CGT CAC CAG CGG TGT G-3'

La sonde utilisée est la suivante :

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

(FAM : carboxyfluoréscéine, TAMRA : tétraméthylrhodamine)

La qualité des amorces et sondes nécessite *a minima* une purification de type RP-HPLC (Reverse Phase - High Performancy Liquid Chromatography).



Autres réactifs du mélange réactionnel

La méthode a été validée avec les réactifs suivants :

- TaqMan Universal PCR Master Mix No AmpErase UNG® (Applied Biosystem, Foster City, Californie, Etats-Unis) (contient du ROX en référence passive pour les thermocycleurs qui le nécessitent)
- MultiScribe Reverse Transcriptase® (Applied Biosystem)
- RNase Inhibitor® (Applied Biosystem)

5.4 Autres réactifs et consommables à usage unique

Les consommables plastiques à usage unique doivent être adaptés aux réactions de biologie moléculaire.

- Sachets de broyage avec filtre
- Pointes à filtre pour pipettes de volumes adaptés
- Microtubes de 2 mL
- Microtubes ou microplaques pour PCR en temps réel de volume adapté au thermocycleur temps réel utilisé
- Tubes de collecte (ou microtubes collecteurs) pour l'utilisation du RNeasy Plant mini Kit
- Consommables spécifiques à l'utilisation de l'automate KingFisher™ ML (Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, Etats-Unis)
 - . barrettes de tubes KingFisher™ ML tube strip 5
 - . peignes KingFisher™ ML Tip comb 5

La décontamination par désinfection et destruction des acides nucléiques des surfaces de travail et du matériel peut être réalisée à l'aide d'hypochlorite de sodium à 1% de chlore actif (m/v) (ou autre produit équivalent).



5.5 Contrôles et témoins

Des témoins de référence (contrôles) ou des réactions de contrôle sont inclus en cours de processus analytique pour valider les différentes étapes de la méthode. Ces contrôles à introduire au cours de l'analyse sont les suivants :

- un contrôle positif de processus (E +) : matrice contenant l'organisme cible et traitée dans les mêmes conditions que les échantillons à analyser. Cette matrice doit produire un résultat positif garantissant la qualité de la manipulation, la qualité et la performance des réactifs d'extraction ainsi que le bon fonctionnement du matériel. Le contrôle positif de processus peut être constitué par exemple, et de préférence, de feuilles ou bourgeons de *Prunus* spp. ou de fleurs de pêcher contaminé(e)s par une des souches du PPV. Toute matrice végétale contenant du PPV avec une charge virale suffisante pour être détectable peut être utilisée (matrice contaminée à l'état frais, congelé ou lyophilisé),

- un contrôle négatif de processus (E -) : matrice ne contenant pas l'organisme cible et traitée dans les mêmes conditions que les échantillons à analyser. Cette matrice doit produire un résultat négatif garantissant l'absence de contamination pendant toutes les étapes du processus. Le contrôle négatif de processus doit être constitué de feuilles ou bourgeons de *Prunus* spp. ou de fleurs de pêcher indemnes du PPV. Il n'est pas nécessaire que les matrices du E - et des échantillons à analyser soient identiques. Toute forme de ces matrices peut être utilisée (état frais, congelé ou lyophilisé),

- un contrôle négatif d'amplification (A -) : eau de qualité biologie moléculaire, mise à la place des acides nucléiques dans le mix réactionnel, et introduite à l'étape d'amplification, devant produire un résultat négatif à l'issue de la manipulation et garantissant l'absence de contamination pendant la phase d'amplification,

- un contrôle positif d'amplification en limite de détection (T+LOD) : solution d'acide nucléique cible d'une dilution proche de la limite de détection de la méthode, introduite à l'étape d'amplification et devant produire un résultat positif à l'issue de la manipulation. Il garantit la qualité de la manipulation, la qualité et les performances optimales des réactifs pendant la phase d'amplification ainsi que le bon fonctionnement du matériel et notamment en cas de faibles déviations des conditions analytiques,

- une réaction de contrôle de la qualité de l'extraction et de l'absence d'inhibition* : réaction ciblant un ARN présent dans l'extrait d'acide nucléique indépendamment du pathogène (comme celle décrite par exemple dans Roenhorst *et al.*, 2005). Celle-ci est une réaction menée à part de la réaction de détection du virus. Elle doit fournir un résultat positif garantissant ainsi le bon déroulement de l'extraction de cette prise d'essai ainsi qu'un niveau d'inhibiteurs compatible avec une détection par RT-PCR. Bien que facultative, la mise en œuvre d'une telle réaction de contrôle est recommandée,

- un contrôle positif d'amplification (A +)* : solution d'acide nucléique cible introduite à l'étape d'amplification devant produire un résultat positif garantissant la qualité de la manipulation, la qualité et la performance des réactifs pendant la phase d'amplification ainsi que le bon fonctionnement du matériel.

* Contrôle facultatif.



6. Appareillage et matériels

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

L'agencement et l'équipement des zones de travail sont définis dans la MOA 022 version en vigueur (document de référence [1]).

Les matériels utilisés dans la méthode doivent satisfaire aux exigences de la MOA 022 version en vigueur (document de référence [1]).

6.1 Préparation des échantillons et broyage

- pH mètre
- Broyeur à billes type Homex 6 (Bioreba, Reinach, Suisse) ou équivalent
- Balance de portée et d'exactitude adaptées à la pesée des échantillons
- Pipettes automatiques
- Petits équipements de laboratoire : ciseaux, pinces, scalpel, sécateur,...

6.2 Extraction des acides nucléiques

- Pipettes automatiques
- Centrifugeuse permettant d'atteindre une force centrifuge relative de 8 000 g (extraction utilisant le RNeasy Plant mini Kit) ou 18 000 g (extraction utilisant le QuickPick SML Plant DNA) et rotors adaptés pouvant recevoir des microtubes de 1,5 et 2 mL
- Centrifugeuse de paillasse
- Automate KingFisher™ ML (extraction utilisant le QuickPick SML Plant DNA)
- Incubateur (température 65°C) de type thermobloc ou bain-à-sec avec agitation ou enceinte thermostatique avec système d'agitation
- Portoir aimanté (extraction utilisant le QuickPick SML Plant DNA)



6.3 RT-PCR

- Pipettes automatiques
- Thermocycleur PCR en temps réel capable d'exciter et de mesurer la fluorescence du fluorophore « FAM »

Le protocole a été évalué sur plusieurs types de thermocycleurs temps réel : Stratagene MX3005P (Agilent Technologies, Santa Clara, Californie, Etats-Unis), Applied 7500 Fast real-time PCR system (Applied Biosystems) et Rotor Gene Q (Qiagen). D'autres thermocycleurs temps réel peuvent être utilisés dans la mesure où ils produisent des résultats équivalents.

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 (organes non broyés).

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 le cas des échantillons transférés entre laboratoires, les pièces végétales entières doivent avoir été transportées à l'état réfrigéré (si tel était le mode de conservation antécédent) ou à l'état congelé (si tel était le mode de conservation antécédent). Elles peuvent également avoir été préparées pour analyse (feuilles et fleurs découpées et/ou pesées ou bourgeons prélevés du rameau et/ou pesés) et sont dans ce cas transportées à l'état congelé.

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

Si les échantillons arrivent dans un état trop dégradé, 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 transportés à l'état non congelé peuvent être conservés au réfrigérateur pendant une semaine maximum en attente de préparation. Les échantillons transportés à l'état congelé 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 §8.3.3), 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.

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 et décontaminer (cf §5.4) le matériel utilisé ainsi que les surfaces de travail.

Dans le cas d'une analyse sur broyat, le mode opératoire débute à l'extraction des acides nucléiques (§8.3).

8.1 Préparation des échantillons pour analyse

La masse à mettre en œuvre pour une analyse par RT-PCR en temps réel 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 :

- soit dans 10 volumes de tampon d'extraction PBS-PVP10-DIECA (exemple : 1,00 g de matériel végétal frais pour 10,0 mL de tampon) dans le cas d'une extraction avec le RNeasy Plant mini Kit,
- soit dans 5 volumes de tampon d'extraction PBS-PVP10-DIECA (exemple : 1,00 g de matériel végétal frais pour 5,0 mL de tampon) dans le cas d'une extraction avec le QuickPick SML Plant DNA.

Le broyage est réalisé 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 rapidement possible dans la demi-journée.

8.3 Extraction des acides nucléiques

Quelle que soit la technique d'extraction choisie, les contrôles E + et E - décrits au 5.5 doivent être introduits à cette étape pour chaque série d'échantillons extraits en simultané.

Selon la technique d'extraction employée, l'extrait final est soit un extrait d'ARN (RNeasy Plant mini Kit) soit un extrait d'acides nucléiques contenant les ARN (QuickPick SML Plant DNA).



8.3.1 Extraction des ARN avec le RNeasy plant mini kit

Les ARN sont purifiés selon un protocole adapté par Olmos *et al.*, (2005).

Pour chaque échantillon :

1. Dans un microtube, placer 200 μ L de broyat et ajouter 350 μ L de tampon RLT. Bien homogénéiser.
2. Déposer les 550 μ L du mélange RLT/broyat sur la colonne QIAshredder (violette) posée sur le microtube fourni.
3. Centrifuger environ 2 minutes à environ 8 000 g.
4. Jeter la colonne QIAshredder. Transférer le filtrat (environ 500 μ L) dans un microtube contenant 250 μ L d'éthanol absolu (min 95% (v/v)) en veillant à ne pas reprendre le culot de débris cellulaires et homogénéiser par aspirations/ refoulements.
5. Transférer le mélange sur la colonne RNeasy (rose) posée sur le microtube collecteur fourni.
6. Centrifuger environ 1 minute à environ 8 000 g.
7. Jeter le filtrat et replacer la colonne RNeasy sur un nouveau microtube collecteur.
8. Laver la colonne RNeasy en ajoutant 700 μ L de tampon RW1.
9. Centrifuger environ 1 minute à environ 8 000 g.
10. Jeter le filtrat et replacer la colonne RNeasy sur un nouveau microtube collecteur.
11. Laver la colonne RNeasy en ajoutant 500 μ L de tampon RPE.
12. Centrifuger environ 1 minute à environ 8 000 g.
13. Jeter le filtrat et replacer sur un nouveau microtube collecteur.
14. Laver la colonne RNeasy en ajoutant 500 μ L de tampon RPE.
15. Centrifuger environ 2 minutes à environ 8 000 g.
16. Jeter le filtrat et le microtube collecteur.
17. Placer la colonne RNeasy sur le microtube de 1,5 mL fourni.
18. Eluer l'ARN avec 50 μ L d'eau de qualité « biologie moléculaire ».
19. Centrifuger environ 1 minute à environ 8 000 g.
20. Jeter la colonne RNeasy et conserver l'extrait d'ARN en attente de son utilisation.



8.3.2 Extraction des acides nucléiques avec le QuickPick SML Plant DNA

Cette partie du protocole nécessite l'automate KingFisher™ ML ainsi que les barrettes et peignes plastiques décrits au point 5.4.

Il permet d'obtenir simultanément 15 extraits d'acides nucléiques (soit 13 échantillons et les contrôles E + et E -).

Etapes préalables et lyse cellulaire :

- Dans un microtube, placer 150 µL de broyat et ajouter 150 µL de tampon Lysis buffer.
- Ajouter dans chaque microtube 10 µL de protéinase K.
- Remarque : il est possible de préparer une solution de protéinase K et de tampon Lysis buffer extemporanément afin d'ajouter 160 µL de ce mélange aux 150 µL de broyat.
- Vortexer.
- Incuber le lysat environ 20 minutes à 65°C avec agitation régulière.

Extraction automatisée des acides nucléiques :

Opérations préalables :

- Remettre les billes magnétiques (Plant DNA magnetic particles) en suspension par agitation manuelle et/ou pipetage (ne pas vortexer).
- Disposer les barrettes de tubes sur le plateau de l'automate.
- Disposer les peignes sur les aimants dans l'automate, en veillant au sens et à l'alignement.
- Déposer les solutions tampons dans les puits des barrettes de tubes, selon le schéma suivant :

Etape	Binding		Wash 1	Wash 2	Wash 3	Elution
Côté gauche = languette	A		B	C	D	E
Tampon	Binding buffer	Magnetic particles	Wash buffer	Wash buffer	Wash buffer	Elution buffer
Volume (µL)	250	10	500	500	500	100

Plan de dépôt des solutions tampons dans une barrette de tubes

Extraction et élution des acides nucléiques :

- Centrifuger le lysat environ 5 min à environ 18 000 g à température ambiante.
- Reprendre la totalité du surnageant (env. 310 µL) et la déposer dans le puits A de la barrette de tubes.
- Mettre le plateau dans l'appareil.
- Allumer l'automate et démarrer le programme spécifique (durée environ 31 minutes). Le programme est décrit en annexe 2.



Transfert final des acides nucléiques :

- Sortir le plateau.
- Transférer les éluats du tube E (contenant les acides nucléiques) dans un microtube.
- Positionner les microtubes sur un portoir aimanté pendant environ 5 minutes au minimum. Si un reliquat de microbilles est présent (culot de billes le long du tube), transférer les extraits d'acides nucléiques dans un nouveau tube.

La solution d'acides nucléiques est alors prête à l'emploi.

8.3.3 Conservation des extraits

Les extraits d'acides nucléiques sont conservés au réfrigérateur pour une utilisation dans la demi-journée ou au congélateur (froid intense de préférence) pour une utilisation différée de plus d'une demi-journée.

8.4 RT-PCR en temps réel

Pour chaque extrait, un minimum de deux réactions RT-PCR doit être réalisé.

Les contrôles décrits au §5.5 doivent être introduits à cette étape pour chaque série d'échantillons analysés en simultané. Pour chaque contrôle utilisé, une seule réaction RT-PCR peut être utilisée (deux tubes sont néanmoins conseillés).

Préparer le mélange réactionnel suivant :

Réactifs	Concentration initiale	Concentration finale (impérative)	Volume / microtube (en µL)
Eau de qualité biologie moléculaire	/	/	5,26
TaqMan Universal PCR Master Mix, No AmpErase UNG	2X	1X	15,00
MultiScribe	50 U/µL	1 U/µL	0,60
RNAse Inhibitor Mix	20 U/µL	1U/µL	1,50
P241	25 µmol/L	1 µmol/L	1,20
P316M	25 µmol/L	0,5 µmol/L	0,60
P316D	25 µmol/L	0,5 µmol/L	0,60
Sonde PPV-DM	25 µmol/L	0,2 µmol/L	0,24
Mix			25,00

Le laboratoire peut modifier la concentration initiale en amorces et sonde. Il devra réajuster les calculs des volumes de manière à assurer la concentration finale pour chaque constituant du mix.

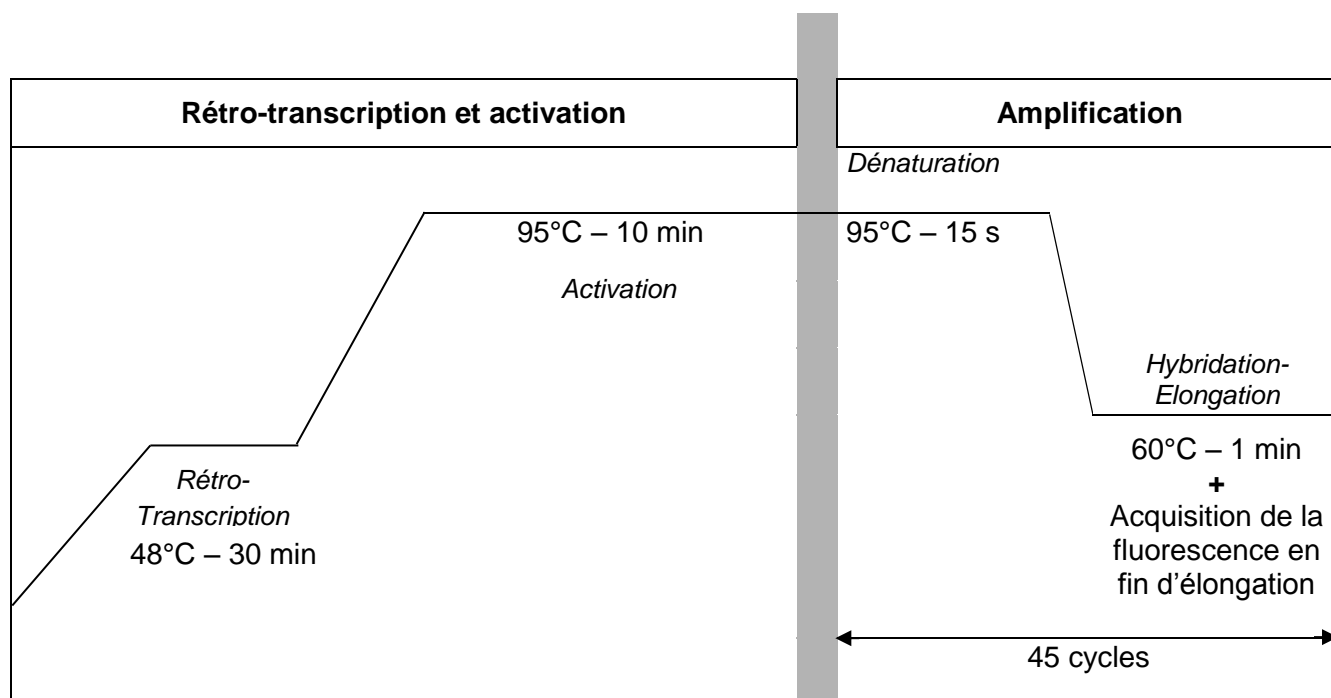


Distribuer les **25 µL** de mix dans chaque tube réactionnel.

Ajouter **5 µL** d'extrait d'acides nucléiques par tube réactionnel.

Le mélange réactionnel a un volume total de **30 µL**.

Programmation du thermocycleur :



9. Résultats

9.1 Contrôle de la validité des résultats

Il appartient au laboratoire de déterminer la valeur de la ligne seuil (« threshold ») dans ses conditions expérimentales.

Pour la détermination de la ligne de seuil, il est possible d'utiliser la détermination automatique réalisée avec le logiciel du thermocycleur ou de positionner la ligne de seuil manuellement, une valeur de logarithme décimal au-dessus de la valeur de bruit de fond la plus élevée ou de décider d'une valeur fixe indépendante de l'opérateur à partir de valeurs de bruits de fond. Selon le type de thermocycleur et de logiciel utilisés, il est possible de retenir d'autres règles pour la détermination de la ligne de seuil.

S'il le juge nécessaire, le laboratoire peut décider d'évaluer la pertinence de l'usage d'un Cut-off (ou cycle seuil limite) et de déterminer sa valeur dans ses conditions expérimentales.

Le Cut-off représente la plus grande valeur de Ct qui permet de considérer l'échantillon positif. Au-delà du Cut-off, l'échantillon est considéré comme négatif.



Il doit être déterminé par chaque laboratoire, sur son propre thermocycleur temps réel et dans ses conditions de travail. Il est propre à chaque PCR (réaction spécifique du PPV et réaction de contrôle de la qualité de l'extraction et de l'absence d'inhibition si elle est mise en œuvre).

Pour la détermination du Cut-off, il est possible d'utiliser une valeur arrondie de la moyenne des Ct issue de 10 réplicats d'analyse de l'ultime dilution d'échantillons positifs donnant 100% de détection (10 valeurs de Ct). Il est possible de retenir d'autres règles pour la détermination du Cut-off (comme par exemple citées dans Grosdidier *et al.*, 2017).

A titre d'exemple, pour la réaction spécifique du PPV, la valeur de Cut-off retenue lors de la validation initiale de la méthode est de 40.

Pour la réaction de contrôle de la qualité de l'extraction et de l'absence d'inhibition, plusieurs valeurs de Cut-off peuvent être retenues selon que l'on considère les extraits d'acides nucléiques des échantillons ou les contrôles de réaction (A - et T+LOD par exemple).

Validation de l'amplification :

Pour l'ensemble des tubes analysés en simultanément, le bon déroulement d'une amplification (réaction spécifique du PPV ou réaction de contrôle) est validé si tous les témoins utilisés donnent les résultats attendus suivants :

- le contrôle négatif d'amplification (A -) ne donne aucune fluorescence significative (Ct supérieur à la valeur de Cut-off ou pas de Ct ou courbe non exponentielle),
- le contrôle positif en limite de détection (T+LOD) présente une courbe de fluorescence exponentielle, présentant une intersection avec la ligne seuil et un Ct inférieur à la valeur de Cut-off,
- le contrôle positif d'amplification (A +) présente une courbe de fluorescence exponentielle, présentant une intersection avec la ligne seuil et un Ct inférieur à la valeur de Cut-off (pour rappel, ce contrôle n'est pas obligatoire),

Si une amplification est invalidée, une nouvelle amplification doit être réitérée à partir des extraits d'acides nucléiques conservés.

Validation de l'extraction :

L'extraction est validée si tous les témoins et réaction de contrôle utilisés donnent les résultats attendus suivants :

Pour chaque extrait d'acides nucléiques des échantillons et le E -

- la réaction de contrôle de la qualité de l'extraction et de l'absence d'inhibition présente une courbe de fluorescence exponentielle, présentant une intersection avec la ligne seuil et un Ct inférieur à la valeur du Cut-off (pour rappel, la mise en œuvre de cette réaction de contrôle n'est pas obligatoire).



Pour l'ensemble des échantillons extraits en simultané :

- le contrôle négatif de processus (E -) ne donne pas de fluorescence significative pour la réaction spécifique du PPV (Ct supérieur à la valeur de Cut-off ou pas de Ct ou courbe non exponentielle),
- le contrôle positif de processus (E +) présente une courbe de fluorescence exponentielle pour la réaction spécifique du PPV, présentant une intersection avec la ligne seuil et un Ct inférieur à la valeur de Cut-off.

Si l'extraction est invalidée, celle-ci doit être réitérée sur le reliquat de matériel végétal conservé.

9.2 Calculs et expression des résultats

9.2.1 Interprétation des résultats

Lorsque toutes les conditions précédentes sont remplies, puits à puits, les résultats de l'amplification spécifique du PPV sont interprétés comme suit :

	Statut par puits
Courbe de fluorescence exponentielle, présentant une intersection avec la ligne seuil et un Ct < Cut-off	Positif ou +
Courbe de fluorescence non exponentielle ou Courbe présentant une intersection avec la ligne seuil et un Ct ≥ Cut-off ou Pas de Ct	Négatif ou -

Pour chaque échantillon, l'analyse est qualitative et les résultats s'interprètent de la manière suivante :

Analyse		Résultat
Puits 1	Puits 2	
+	+	POSITIF
+	-	INDETERMINÉ →RT-PCR à refaire. Si au moins 1 puits sur 2 est positif lors de la 2 ^{ème} amplification, le résultat est interprété comme positif. Si les deux puits sont négatifs, le résultat est interprété comme négatif
-	-	NEGATIF



9.2.2 Formulation du résultat d'analyse

Le résultat final de l'analyse est de type qualitatif et peut être formulé des façons suivantes :

- Lorsque le résultat est positif : **PPV détecté dans l'échantillon analysé**
- Lorsque le résultat est négatif : **PPV 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] et [3])).

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 : -5 échantillons de terrain (pêchers et pruniers) reconnus contaminés par le PPV -2 isolats de PPV souche D sur pêcher -2 isolats de PPV souche M sur pêcher -1 isolat de PPV souche Rec sur prunier Les échantillons ont été testés en 4 réplicats à raison de deux puits par réplicat.
Spécificité	Pourcentage d'échantillons non détectés parmi les échantillons non-cibles	98,8%	10 échantillons non cibles constitués de : -4 échantillons de terrain (pêchers et pruniers) reconnus indemnes de PPV -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) Les échantillons ont été testés en 4 réplicats à raison de deux puits par réplicat. Un des 8 puits d'un échantillon de pêcher sain a montré un résultat positif.
Exactitude	Pourcentage de vrais positifs et de vrais négatifs parmi des échantillons cibles et des échantillons non-cibles respectivement	99,4%	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 concentration le plus bas pour lequel 100% des résultats sont positifs	Entre les dilutions 1/100 et 1/10.000 selon les échantillons	Des gammes de dilutions décimales ont été constituées à partir de 5 échantillons contaminés par le PPV. -2 échantillons de prunier de terrain (souche non connue) -1 échantillon de pêcher contaminé par un isolat de souche M -1 échantillon de pêcher contaminé par un isolat de souche D -1 échantillon de prunier contaminé par un isolat de la souche Rec Chaque dilution a été testée en triplicat à raison de deux puits par réplicat.
Répétabilité	Pourcentage d'accords entre résultats pour les mêmes échantillons dans les conditions de répétabilité	98,6%	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.
Reproductibilité	Pourcentage de	98,3%	Les extraits d'acides nucléiques de 10 échantillons



	résultats concordants pour les mêmes échantillons dans les conditions de reproductibilité testées		contaminés par le PPV (5 issus de terrain, 2 isolats souche D, 2 isolats souche M et 1 isolat souche Rec) ainsi que 10 échantillons non cibles (5 « sains » et 5 contaminés par d'autres virus) ont été utilisés. Deux laboratoires différents ont testé les mêmes extraits dont un sur deux thermocycleurs différents avec le même opérateur. Trois thermocycleurs différents ont été utilisés Stratagene MX3005P, Applied 7500 Fast real-time PCR system et Rotor Gene Q. Les extraits ont tous été testés en triplicat à raison de deux puits par réplicat.
--	---	--	--

Le rapport de validation complémentaire (document de référence [4]) a 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%	-1 isolat de PPV souche C dilué au 1/20 -1 isolat de PPV souche EA dilué au 1/20 -1 isolat de PPV souche T dilué au 1/20 -1 isolat de PPV souche CR dilué au 1/20 -1 isolat de PPV souche W dilué au 1/20 -1 isolat de PPV souche An dilué au 1/20 Les échantillons ont été testés en 10 réplicats à raison d'un puits par réplicat.
Sélectivité	Pourcentage d'échantillons détectés parmi les échantillons dopés	100%	6 extraits d'acides nucléiques d'espèces différentes de <i>Prunus</i> ou d'hybrides de <i>Prunus</i> , chacun dopé au 1/1 000 par un extrait d'acides nucléiques d'isolat de PPV souche D puis par un extrait d'acides nucléiques d'isolat de PPV souche M. - <i>Prunus persica</i> - <i>Prunus armeniaca</i> - <i>Prunus domestica</i> - <i>Prunus persica</i> x <i>Prunus davidiana</i> - <i>Prunus mahaleb</i> x <i>Prunus avium</i> - <i>Prunus salicina</i> x <i>Prunus spinosa</i> Les échantillons ont été testés en 8 réplicats à raison d'un puits par réplicat.



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

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>5 échantillons non cibles constitués d'extraits d'acides nucléiques de bourgeons issus de différentes espèces de Prunus ou d'hybrides de Prunus reconnus indemnes de PPV ont été testés.</p> <ul style="list-style-type: none"> -<i>Prunus persica</i> (pêcher cv. Monclar) -<i>Prunus armeniaca</i> (abricotier cv. Manicot) -<i>Prunus domestica</i> (prunier domestique cv. Ente) -<i>Prunus mahaleb</i> x <i>Prunus avium</i> (hybride de cerisier cv. MM14) -<i>Prunus salicina</i> x <i>Prunus spinosa</i> (hybride de pruniers cv. Jaspi) <p>Les échantillons ont été testés en 6 réplicats à raison d'un puits par réplicat.</p>
Sélectivité « bourgeons »	Pourcentage d'échantillons détectés parmi les échantillons non cibles dopés	96,7%	<p>5 échantillons d'extraits d'acides nucléiques de bourgeons de différentes espèces de prunus ou d'hybrides de prunus reconnus indemnes de PPV ont été testés. Chaque extrait a été dopé par de l'extrait d'acides nucléiques obtenu à partir d'une feuille infectée par le PPV de manière à obtenir une concentration située à 10 fois le seuil de détection préalablement déterminé pour cet extrait de feuille (le volume d'extrait de bourgeons représentant 99% du volume total testé).</p> <ul style="list-style-type: none"> -<i>Prunus persica</i> (pêcher cv. Monclar) -<i>Prunus armeniaca</i> (abricotier cv. Manicot) -<i>Prunus domestica</i> (prunier domestique cv. Ente) -<i>Prunus mahaleb</i> x <i>Prunus avium</i> (hybride de cerisier cv. MM14) -<i>Prunus salicina</i> x <i>Prunus spinosa</i> (hybride de prunier cv. Jaspi) <p>Les échantillons ont été testés en 6 réplicats à raison d'un puits par réplicat.</p> <p>La PPV n'a pas été détecté dans un seul réplicat d'un extrait de bourgeons de <i>Prunus domestica</i> dopé.</p>
Spécificité M « fleurs »	Pourcentage d'échantillons non détectés parmi les échantillons non - cibles	100%	<p>3 échantillons non cibles constitués d'extraits d'acides nucléiques de fleurs issus de différents cultivars de pêchers ou d'hybrides reconnus indemnes de PPV ont été testés.</p> <ul style="list-style-type: none"> -<i>Prunus persica</i> (pêcher cv. GF 305) -<i>Prunus persica</i> (pêcher cv. Monclar) -<i>Prunus persica</i> x <i>Prunus davidiana</i> (hybride cv. Cadaman) <p>Les échantillons ont été testés en 6 réplicats à raison d'un puits par réplicat.</p>
Sélectivité « fleurs »	Pourcentage d'échantillons détectés parmi les échantillons non cibles dopés	100%	<p>3 échantillons d'extraits d'acides nucléiques de fleurs de différents cultivars de pêcher ou d'hybrides reconnus indemnes de PPV ont été testés. Chaque extrait a été dopé par de l'extrait d'acides nucléiques obtenu à partir d'une feuille contaminée par le PPV de manière à obtenir une concentration située à 10 fois le seuil de détection</p>



			<p>préalablement déterminée pour cet extrait de feuille (le volume d'extrait de fleurs représentant 99% du volume total testé).</p> <p>-<i>Prunus persica</i> (pêcher cv. GF 305) -<i>Prunus persica</i> (pêcher cv. Monclar) -<i>Prunus persica</i> x <i>Prunus davidiana</i> (hybride cv. Cadaman)</p> <p>Les échantillons ont été testés en six réplicats à raison d'un puits par réplicat.</p>
--	--	--	--

Le rapport de validation complémentaire (document de référence [6]) a permis de compléter les données de performance de la méthode vis-à-vis de la matrice feuille extraite de manière automatisée avec le QuickPick SML Plant DNA avec le KingFisher™ ML. Ces données ont toutes été obtenues lors d'une comparaison réalisée avec les mêmes broyats végétaux extraits de manière manuelle avec le RNeasy Plant mini Kit à l'exception des données générées pour la spécificité.

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% pour les deux modalités d'extraction	<p>9 souches du PPV ont été testées :</p> <ul style="list-style-type: none"> -1 isolat de PPV souche D -1 isolat de PPV souche M -1 isolat de PPV souche Rec -1 isolat de PPV souche EA -1 isolat de PPV souche T -1 isolat de PPV souche C (Soc) -1 isolat de PPV souche CR -1 isolat de PPV souche W -1 isolat de PPV souche An <p>Les échantillons de broyats de feuilles ont été testés en deux réplicats par modalité d'extraction à raison de deux puits par réplicat.</p>
Spécificité	Pourcentage d'échantillons non détectés parmi les échantillons non-cibles	100% pour la modalité d'extraction QuickPick SML Plant DNA	<p>5 échantillons non cibles constitués de :</p> <ul style="list-style-type: none"> -<i>Prunus persica</i> x <i>Prunus davidiana</i> (hybride cv. Cadaman) -<i>Prunus armeniaca</i> (abricotier cv. Manicot) -<i>Prunus mahaleb</i> X <i>Prunus avium</i> (hybride de cerisier cv. MM14) -<i>Prunus domestica</i> (prunier) -<i>Prunus salicina</i> x <i>Prunus spinosa</i> (hybride de prunier cv. Jaspé) <p>Les échantillons de broyats de feuilles ont été testés en 6 réplicats par modalité d'extraction à raison de deux puits par réplicat.</p>
Seuil de détection	Niveau de concentration le plus faible pour lequel 100% des résultats sont positifs	1/100.000 pour les deux modalités d'extraction	<p>Une gamme de dilutions décimales a été constituée à partir d'un broyat d'échantillon de feuilles infectées par le PPV et dilué dans du broyat de feuilles de <i>Prunus persica</i> (pêcher cv. GF 305).</p> <p>Les échantillons de broyats de feuilles ont été testés en 10 réplicats par modalité d'extraction à raison de deux puits par réplicat.</p>
Sélectivité	Pourcentage d'échantillons détectés parmi les échantillons non cibles dopés	100% pour les deux modalités d'extraction	<p>5 échantillons de broyats de feuilles d'espèces de <i>Prunus</i> ou d'hybrides de <i>Prunus</i> reconnus indemnes de PPV ont été testés. Chaque broyat a été dopé par du broyat de feuilles infectées par le PPV de manière à obtenir une concentration située à 10 fois le seuil de détection préalablement</p>



			<p>déterminée pour ce broyat de feuilles (le volume de broyat de feuilles à tester représentant 99% du volume total mis en œuvre).</p> <ul style="list-style-type: none">-<i>Prunus persica</i> x <i>Prunus davidiana</i> (hybride cv. Cadaman)-<i>Prunus armeniaca</i> (abricotier cv. Manicot)-<i>Prunus mahaleb</i> X <i>Prunus avium</i> (hybride de cerisier cv. MM14)-<i>Prunus domestica</i> (prunier cv. Ente)-<i>Prunus salicina</i> x <i>Prunus spinosa</i> (hybride de prunier cv. Jaspi) <p>Les échantillons de broyat de feuilles ont été testés en 6 réplicats par modalité d'extraction à raison de deux puits par réplicat.</p>
--	--	--	---



Annexe 1 : Tampon d'extraction PBS-PVP10-DIECA

Nom produit	Quantité en g
NaCl	8,00
KCl	0,20
Na ₂ HPO ₄ ,12H ₂ O ou Na ₂ HPO ₄ anhydre	2,90 1,15
KH ₂ PO ₄	0,20
Eau déminéralisée	<i>Compléter à environ 800 mL</i>
Ajuster à pH 7,2 - 7,4	
Polyvinylpyrrolidone PVP10	20,00
Sodium diethyl dithiocarbamate DIECA trihydraté	2,00
Eau déminéralisée	Compléter à 1 L

Le tampon peut se conserver 1 mois à l'état réfrigéré ou 2 ans à l'état congelé.



Annexe 2 : Programme d'extraction de l'automate KingFisher™ ML

Script adapté au logiciel BindIt version 3.3.1

LAYOUTS

Plate / Strip name : Extraction

Type = tubestrip 1 000 µL

Content information

Well name : A

- Reagent name = Lysat / volume = 310 µL,
- Reagent name = magnetic particules / volume = 10 µL ,
- Reagent name = binding buffer / volume = 250 µL,

Well name : B:

- Reagent name = Wash buffer / volume = 500 µL,

Well name : C:

- Reagent name = Wash buffer / volume = 500 µL,

Well name : D:

- Reagent name = Wash buffer / volume = 500 µL,

Well name : E:

- Reagent name = Elution Buffer / volume = 100 µL.

PROTOCOL

CAPTURE

Beginning of step

Precollect No
Release beads No

Mixing parameters

Mixing time 00:10:00 speed Medium

Pause

Pause for manual handling No

End of step

Postmix No
Collect beads, count 5 Collect time [s] 10

Plate / Strip : Extraction

Tube : A

LAVAGE 1

Beginning of step

Precollect No
Release beads 00:00:10 speed Medium

Mixing parameters

Mixing time 00:00:20 speed Medium



Pause	Pause for manual handling	No		
End of step	Postmix Collect beads, count	No 5		Collect time [s] 10
Plate / Strip : Extraction				
Tube : B				
LAVAGE 2				
Beginning of step	Precollect Release beads	No 00:00:10	speed	Medium
Mixing parameters	Mixing time	00:00:20	speed	Medium
Pause	Pause for manual handling	No		
End of step	Postmix Collect beads, count	No 5		Collect time [s] 10
Plate / Strip : Extraction				
Tube : C				
LAVAGE 3				
Beginning of step	Precollect Release beads	No 00:00:10	speed	Medium
Mixing parameters	Mixing time	00:00:20	speed	Medium
Pause	Pause for manual handling	No		
End of step	Postmix Collect beads, count	No 5		Collect time [s] 10
Plate / Strip : Extraction				
Tube : D				
ELUTION				
Beginning of step	Precollect Release beads	No 00:00:10	speed	Medium



Mixing parameters

Mixing time	00:10:00	speed	Slow
-------------	----------	-------	------

Pause

Pause for manual handling	No
---------------------------	----

End of step

Postmix	No		
Collect beads, count	5	Collect time [s]	10

Plate / Strip : Extraction

Tube : E

DEPOSE BILLES

Release time	00:00:05	speed	Fast
--------------	----------	-------	------

Plate / Strip : Extraction

Tube : D

Nota bene : ci-nécessaire, le script informatique du programme est disponible auprès du LNR.



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 Moldova. *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: *22nd 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