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

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

NIMP 27
ANNEXE 2

FRE

PROTOCOLES DE DIAGNOSTIC NORMES INTERNATIONALES POUR LES MESURES PHYTOSANITAIRES 27

PD 2:
Plum pox virus

Cette page est intentionnellement laissée vierge

Le présent protocole de diagnostic a été adopté par le Comité des normes au nom de la Commission des mesures phytosanitaires en août 2018.

Cette annexe constitue une partie prescriptive de la NIMP 27.

NIMP 27
Protocoles de diagnostic pour les organismes nuisibles réglementés

PD 2: *Plum pox virus*

Adopté en 2018; publié en 2019

TABLE DES MATIÈRES

1. Informations sur l'organisme nuisible 2
2. Données taxonomiques 3
3. Détection et identification 3
3.1 Plantes hôtes 3
3.2 Symptômes 4
3.3 Détection biologique 4
3.4 Échantillonnage pour les analyses sérologiques et moléculaires 5
3.5 Détection et identification sérologiques 5
3.5.1 Analyse par dosage immunoenzymatique indirect utilisant deux antisérums spécifiques (DASI-ELISA) 6
3.5.2 Analyse par dosage immunoenzymatique utilisant deux antisérums spécifiques (DAS-ELISA) 6
3.6 Détection et identification moléculaires 7
3.6.1 Purification de l'ARN, immunocapture et synthèse de l'ADN complémentaire 7
3.6.2 Transcription inverse suivie d'une réaction d'amplification génique 7
3.6.3 Immunocapture - transcription inverse suivie d'une réaction d'amplification génique 8
3.6.4 Méthode coopérationnelle transcription inverse suivie d'une réaction d'amplification génique 9
3.6.5 Transcription inverse suivie d'une réaction d'amplification génique en temps réel 9
4. Identification des souches 11
4.1 Identification sérologique des souches 12
4.2 Identification moléculaire des souches 13
4.2.1 Transcription inverse suivie d'une réaction d'amplification génique 13
4.2.2 Immunocapture - transcription inverse suivie d'une réaction d'amplification génique 14
4.2.3 Méthode coopérationnelle transcription inverse suivie d'une réaction d'amplification génique 14
4.2.4 Transcription inverse suivie d'une réaction d'amplification génique en temps réel 14
5. Témoins employés dans les analyses moléculaires 15
6. Archives à conserver 16
7. Points de contact pour tout complément d'informations 16
8. Remerciements 17
9. Références 17

1. Informations sur l'organisme nuisible

La sharka est l'une des maladies virales les plus graves des fruits à noyaux. Elle a été signalée pour la première fois dans *Prunus domestica* en Bulgarie en 1917-1918 et elle a été décrite comme maladie virale en 1932. Depuis lors, le virus s'est disséminé progressivement dans une grande partie de l'Europe, sur les pourtours du bassin méditerranéen et au Proche-Orient. Sa présence a été observée dans une aire de répartition restreinte, en Amérique du Nord, en Amérique du Sud et en Asie (OEPP, 2006; CABI, 2018).

La sharka, causée par le *Plum pox virus* (PPV), affecte les espèces du genre *Prunus* (famille des *Rosaceae*). Elle est particulièrement nuisible à *Prunus armeniaca*, *P. domestica*, *P. persica* et *P. salicina* parce qu'elle entraîne une dégradation de la qualité des fruits et leur chute précoce. On estime que le coût de la gestion de la sharka dans le monde depuis les années 70 est supérieur à 10 milliards d'EUR (Cambra *et al*., 2006b).

Le PPV appartient au genre *Potyvirus*, de la famille des *Potyviridae*. Les particules virales se présentent sous la forme de filaments sinueux d'environ 700 nm × 11 nm et sont composées d'une molécule d'ARN à un seul brin constituée de près de 10 000 nucléotides recouverts par un maximum de 2 000 sous-unités d'une protéine d'enveloppe unique (García *et al.*, 2014). Sur le terrain, le PPV est transmis par des pucerons d'une manière non persistante mais c'est principalement à l'occasion du déplacement de matériel végétal de multiplication infecté qu'il se dissémine sur de grandes distances. La transmission par l'intermédiaire de semences et pollens n'a pas été confirmée (Pasquini et Barba, 2006; Ilardi et Tavazza, 2015). En conditions expérimentales, il est possible de transmettre le PPV mécaniquement à de nombreuses espèces du genre *Prunus* et à plusieurs espèces herbacées telles qu'*Arabidopsis thaliana*, *Chenopodium foetidum*, *Nicotiana benthamiana*, *Nicotiana clevelandii*, *Nicotiana glutinosa* et *Pisum sativum* (Barba *et al*., 2011).

À l'heure actuelle, on peut classer les isolats de PPV selon neuf souches monophylétiques: D (Dideron), M (Marcus), C (Cherry), EA (El Amar), W (Winona), Rec (Recombinant), T (Turkish), CR (Cherry Russian) et An (Ancestor Marcus) (James *et al*., 2013). Les souches possèdent des séquences génomiques spécifiques et peuvent présenter des différences s'agissant des symptômes, de la pathogénicité, de la gamme d'hôtes, de l'épidémiologie et de la transmissibilité par le biais de pucerons. La majorité des isolats de PPV appartiennent aux souches D et M. Les souches D et M du PPV peuvent aisément infecter *P. armeniaca* et *P. domestica* mais n'ont pas les mêmes capacités d'infection sur les cultivars de *P. persica*. Leur pouvoir pathogène est variable; ainsi, les isolats M provoquent généralement, chez les espèces *P. armeniaca*, *P. domestica*, *P. persica* et *P. salicina*, des épidémies plus rapides et des symptômes plus graves que les isolats D. Les isolats EA sont géographiquement limités à l'Égypte et on ne dispose pas de beaucoup de données sur leur épidémiologie et leurs propriétés biologiques. Des isolats du PPV infectant *P. avium* et *P. cerasus* ont été identifiés dans plusieurs pays européens. Ces isolats forment deux souches distinctes désignées PPV-C et PPV-CR. Un PPV atypique a été isolé dans *P. domestica*, au Canada, le PPV-W, qui correspond à une souche distincte de PPV. PPV-W a depuis été détectée dans plusieurs pays d'Europe (James *et al.*, 2013). En outre, les recombinants naturels entre les souches D et M de PPV ont été décrits comme étant des PPV-Rec présentant un comportement épidémiologique analogue au type D. Un second type d'isolat recombinant, signalé en Turquie, a été désigné souche T (Ulubaş Serçe *et al*., 2009). Un isolat unique de la souche PPV-An a été décrit et proposé comme ancêtre potentiel de PPV-M (Palmisano *et al*., 2012). Une nouvelle souche supposée adaptée à la griotte (Tat), différente de C et CR, a également été proposée (Chirkov *et al*., 2016).

On trouvera de plus amples informations sur le PPV, et notamment des illustrations des symptômes de la maladie, dans Barba *et al.* (2011), CABI (2018), OEPP (2004, 2006, 2018b), García *et al*. (2014) et PaDIL (2018).

2. Données taxonomiques

Nom: *Plum pox virus* (abréviation PPV)

Synonyme: *Sharka virus*

Classement taxinomique: *Potyviridae*, *Potyvirus*

Noms communs: Sharka, virus de la sharka

3. Détection et identification

Le PPV peut être détecté par des analyses biologiques, sérologiques ou moléculaires; l'identification s'effectue par analyse soit sérologique, soit moléculaire. Il faut procéder au minimum à une analyse soit sérologique, soit moléculaire pour détecter et identifier le PPV, en particulier pendant un diagnostic de routine d'un organisme nuisible dont on sait qu'il est largement établi dans un pays. Dans les cas où l'organisation nationale de la protection des végétaux (ONPV) exige un niveau de confiance supplémentaire pour l'identification du PPV (par exemple en cas de détection dans une zone où la présence du virus n'a pas été signalée ou en cas de détection dans un envoi provenant d'un pays où l'organisme nuisible est déclaré absent), d'autres analyses peuvent être réalisées pour confirmer l'identification. Lorsque l'identification initiale a été faite en utilisant une méthode moléculaire, ces autres analyses devraient reposer sur une méthode dont la sensibilité d'analyse est supérieure ou, si c'est possible, sur une méthode moléculaire qui cible une autre région du génome ou fondée sur une analyse des séquences différente. D'autres analyses peuvent être réalisées au moyen notamment de méthodes sérologiques qui ciblent des éléments protéiques, ou de méthodes permettant d'identifier la souche de PPV présente. Dans tous les cas, des témoins positifs et négatifs doivent être inclus dans les analyses. Les techniques recommandées sont décrites dans les sections suivantes.

Ce protocole de diagnostic décrit des méthodes bien établies pour la détection et l'identification du PPV. De nouvelles techniques avancées ont été mises en œuvre pour détecter le PPV, comme l'amplification isotherme induite par boucle (Varga et James, 2006b) et le séquençage nouvelle génération (Rodamilans *et al*., 2014). Cependant, dans la mesure où le séquençage nouvelle génération et l'amplification isotherme induite par boucle (LAMP)[1] ne constituent pas des outils entièrement validés pour la détection de routine du PPV et ne sont pas assortis de protocoles décrits et publiés, le présent protocole de diagnostic ne porte pas sur ces techniques.

Dans le présent protocole de diagnostic, les méthodes (et notamment la mention des noms commerciaux) sont indiquées telles que publiées, car ce sont elles qui définissent les niveaux de sensibilité, spécificité et reproductibilité initialement obtenus. Les procédures de laboratoire présentées dans les protocoles peuvent être adaptées aux normes des divers laboratoires, sous réserve qu'elles soient validées de façon adéquate.

3.1 Plantes hôtes

Dans des conditions naturelles, le PPV infecte directement les arbres fruitiers du genre *Prunus* (famille des *Rosaceae*) utilisés comme variétés commerciales ou porte-greffes. Parmi les principaux hôtes figurent *Prunus armeniaca, P. cerasifera, P. davidiana, P. domestica, P. mahaleb, P. marianna, P. mume, P. persica, P. salicina,* ainsi que les hybrides issus de croisements entre ces espèces. Certaines souches de PPV adaptées à la cerise (types C et CR) infectent naturellement *P. avium* et *P. cerasus* (James *et al*., 2013). *Prunus dulcis* peut occasionnellement être infecté par PPV (Llácer et Cambra,

[1] Pour employer régulièrement la méthode LAMP dans une région où elle est visée par un brevet, comme le Japon (numéros de brevet 3 313 358, 3 974 441 et 4 139 424), les États-Unis (US6 410 278, US6 974 670 et US7 494 790), l'Union européenne (nos 1 020 534, 1 873 260, 2 045 337 et 2 287 338), la Chine (ZL008818262), la République de Corée (no de brevet 10-0612551), l'Australie (no 779160) et la Fédération de Russie (no 2 252 964), les opérateurs doivent obtenir une autorisation auprès d'Eiken Chemical Co., Ltd préalablement à l'utilisation, conformément au droit de propriété intellectuelle.

2006). Le virus infecte aussi de nombreuses espèces de *Prunus* sauvages et ornementales comme *P. besseyi, P. cistena, P. glandulosa, P. insititia, P. laurocerasus, P. spinosa, P. tomentosa* et *P. triloba* (James et Thompson, 2006). Dans des conditions expérimentales, le PPV peut être transmis mécaniquement à de nombreuses espèces de *Prunus* et à plusieurs plantes herbacées (voir Section 1).

3.2 Symptômes

Les symptômes du PPV peuvent apparaître sur les feuilles, les pousses, l'écorce, les pétales, les fruits et les noyaux sur le terrain. Ils sont généralement bien visibles sur les feuilles au début de la saison de végétation et présentent une légère décoloration vert pâle, des taches, des bandes ou des anneaux chlorotiques, une décoloration ou un jaunissement des nervures, ou encore une déformation des feuilles. Certains des symptômes visibles sur les feuilles sont analogues à ceux causés par d'autres virus, comme l'*American plum line pattern virus*. L'écorce de *Prunus cerasifera*, cultivar GF 31, présente un aspect liégeux brun-roux et un craquellement.

Sur les fleurs, les symptômes peuvent se traduire par des décolorations (bandes rosâtres) sur les pétales et par des panachures (Barba *et al*., 2011). Ces symptômes floraux peuvent se manifester sur certains cultivars de *P. persica* infectés par PPV-M ou chez *P. glandulosa* infecté par PPV-D.

Les fruits infectés présentent des taches chlorotiques ou encore des anneaux jaunes ou des motifs linéaires légèrement pigmentées. Les fruits peuvent être déformés ou d'aspect irrégulier et développer des zones brunes ou nécrotiques sous les anneaux décolorés. Certaines déformations des fruits, en particulier en ce qui concerne *P. armeniaca* et *P. domestica*, sont analogues à celles que provoque l'*Apple chlorotic leaf spot virus*. Les fruits atteints peuvent être bruns à l'intérieur et exsuder de la gomme, ce qui en diminue la qualité. Dans les cas les plus graves, ils tombent prématurément de l'arbre. En général, les fruits des cultivars hâtifs présentent des symptômes plus marqués que ceux des cultivars plus tardifs. Les noyaux des fruits malades de *P. armeniaca* présentent des anneaux ou des taches de décoloration typiques. Les spiritueux et autres alcools produits à partir des fruits malades ne sont pas commercialisables en raison de leur goût désagréable.

L'apparition et l'intensité des symptômes dépendent en grande partie de la plante hôte et des conditions climatiques. En climat froid, le virus peut rester à l'état latent pendant plusieurs années.

Des symptômes de PPV sur différents hôtes peuvent être consultés, par exemple, sur le site web de la base de données mondiale de l'OEPP (Organisation européenne et méditerranéenne pour la protection des plantes) (https://gd.eppo.int/taxon/PPV000).

3.3 Détection biologique

Les principales plantes indicatrices utilisées pour l'indexation du PPV sont de jeunes plants de *P. cerasifera* cultivar GF 31, de P. *persica* cultivar GF 305, de *P. persica* × *P. davidiana* cultivar Nemaguard ou de *P. tomentosa*. Les plantes indicatrices sont issues de semences plantées dans des terreaux bien drainés et maintenues dans une serre protégée contre les insectes à une température comprise entre 18 °C et 25 °C jusqu'à ce qu'elles soient suffisamment grandes pour être greffées (leur hauteur est généralement de 25 à 30 cm et leur diamètre de 3 à 4 mm). Il est également possible de greffer des greffons des plantes indicatrices sur de jeunes plants d'autres espèces de *Prunus*. Les plantes indicatrices doivent être inoculées par greffage selon des méthodes classiques comme l'écussonnage (Desvignes, 1999), en utilisant quatre répétitions par plante indicatrice. Les plantes indicatrices greffées sont conservées dans les mêmes conditions. Trois semaines plus tard, elles sont taillées à quelques centimètres au-dessus de la greffe supérieure (Gentit, 2006). Les plantes greffées devraient être inspectées pendant six semaines au moins pour la recherche des symptômes. Les symptômes, notamment les bandes et les marbrures chlorotiques, sont observés au bout de trois à quatre semaines sur les parties nouvellement poussées et doivent être comparés à des témoins positifs et à des témoins sains. On trouvera dans Damsteegt *et al*. (1997; 2007) et Gentit (2006) des illustrations des symptômes provoqués par le PPV sur des plantes indicatrices.

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

Il est aussi possible de faire appel à des plantes herbacées pour la détection biologique du PPV (Barba *et al*., 2011). Le PPV peut être transmis mécaniquement à plusieurs espèces de plantes herbacées (voir la Section 1).

3.4 Échantillonnage pour les analyses sérologiques et moléculaires

On trouvera dans la NIMP 31 (*Méthodes d'échantillonnage des envois*) des indications générales sur les méthodes d'échantillonnage. Dans certaines circonstances (par exemple pendant un diagnostic de routine sur un organisme nuisible largement établi dans un pays), on peut conduire une analyse simultanément sur plusieurs végétaux en utilisant comme échantillon un mélange de prélèvements issus de plusieurs végétaux. La décision concernant la conduite d'une analyse sur un ou plusieurs végétaux dépend de la concentration du virus dans les végétaux et du niveau de confiance exigé par l'ONPV. Le matériel végétal issu d'espèces de *Prunus* est souvent expédié sous forme de boutures dormantes. Le cas échéant, les analyses ne peuvent être réalisées directement que sur des bourgeons ou des tissus du phloème (prélevés en raclant l'écorce).

Le soin apporté à la sélection des échantillons est crucial pour détecter le PPV. L'échantillonnage devrait tenir compte de la biologie des virus et des conditions climatiques locales, et en particulier des conditions météorologiques pendant la saison de végétation. Si les symptômes classiques sont présents, il faudrait prélever des échantillons de fleurs, de feuilles ou de fruits présentant des symptômes. Lorsque les végétaux sont asymptomatiques, des échantillons devraient être prélevés sur des pousses d'au moins un an ayant des feuilles à maturité ou des feuilles entièrement dépliées prélevées au milieu de chacune des branches maîtresses (les pousses de moins d'un an ne permettent pas une détection fiable). Les échantillons devraient être prélevés en quatre endroits différents au moins (c'est-à-dire quatre branches ou quatre feuilles) sur chacun des végétaux; c'est indispensable en raison de la répartition irrégulière du PPV. L'échantillonnage ne devrait pas être effectué pendant les mois les plus chauds. Les analyses faites sur des échantillons prélevés en automne sont moins fiables que celles qui sont effectuées sur des échantillons prélevés le printemps précédent. Le matériel végétal devrait être de préférence prélevé à l'intérieur du houppier de l'arbre. Au printemps, les échantillons peuvent être des fleurs, des pousses avec des feuilles entièrement dépliées ou des fruits. En été et en automne, les feuilles à maturité et la peau des fruits mûrs prélevés sur l'arbre ou à la station d'emballage peuvent être utilisées pour l'analyse. En été, on peut analyser les bourgeons des boutures dormantes par transcription inverse suivie d'une réaction d'amplification génique (RT-PCR) ou réaction d'amplification génique (PCR) en temps réel, qui sont par ailleurs les techniques à privilégier pour analyser les feuilles à maturité. Avant l'analyse, il est possible d'entreposer, à 4 °C, les fleurs, les feuilles, les pousses et la peau du fruit pendant 10 jours au maximum, et le fruit pendant un mois. En hiver, les bourgeons dormants ou les tissus de l'écorce de la partie basale des ramilles, des pousses, des branches ou des bouquets de mai complets peuvent être utilisés pour l'analyse.

3.5 Détection et identification sérologiques

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

Pour traiter les échantillons, on coupe en petits morceaux environ 0,2 à 0,5 g de matériel végétal frais, que l'on place dans un tube ou un sachet en plastique approprié. On ajoute environ 4 à 10 ml (1:20 p/v) de tampon d'extraction (ou ce que recommande le fabricant du kit ELISA) et on homogénéise

l'échantillon à l'aide d'un homogénéiseur électrique, d'un rouleau ou d'un marteau manuel ou de tout autre outil analogue. Le tampon d'extraction est composé d'un tampon phosphate salin (PBS) dont le pH est de 7,2 à 7,4 et qui contient 2 pour cent de polyvinylpyrrolidone et 0,2 pour cent de sodium diéthyldithiocarbamate (Cambra *et al.*, 1994) ou d'un autre tampon adapté. Le matériel végétal devrait être frais et homogénéisé avec soin.

3.5.1 Analyse par dosage immunoenzymatique indirect utilisant deux antisérums spécifiques (DASI-ELISA)

L'analyse par dosage immunoenzymatique indirect utilisant deux antisérums spécifiques DASI-ELISA, également appelée ELISA sandwich à trois antisérums TAS-ELISA, devrait être appliquée selon Cambra *et al.* (1994) en utilisant un antisérum monoclonal spécifique tel que 5B-IVIA conformément aux instructions du fabricant.

Il est démontré que l'antisérum monoclonal (MAb) 5B-IVIA détecte la plupart des souches de PPV, si ce n'est toutes (Cambra *et al.*, 2006a). MAb 5B-IVIA détectera les isolats du type CR, mais les extraits réalisés pour l'analyse doivent être ajustés au pH 6,0 afin de stimuler la reconnaissance de MAb 5B-IVIA (Glasa *et al*., 2013; Chirkov *et al*., 2013). Cet antisérum peut également détecter la souche supposée adaptée à la griotte (Tat) (Chirkov *et al*., 2016). Cependant, rien n'indique que MAb 5B-IVIA peut détecter PPV-An (Palmisano *et al.*, 2012).

Dans un essai comparatif DIAGPRO (Harju *et al.*, 2000) effectué par dix-sept laboratoires utilisant un groupe de dix échantillons, certains infectés par le PPV (PPV-D, PPV-M et PPV-D + M) et d'autres sains provenant de France et d'Espagne, la précision de l'analyse DASI-ELISA utilisant MAb 5B-IVIA était de 95 pour cent (nombre de vrais négatifs et de vrais positifs diagnostiqués divisé par le nombre d'échantillons analysés). Cette précision était supérieure à celle obtenue par la méthode d'immunocapture-transcription inverse suivie d'une réaction d'amplification génique (IC-RT-PCR), dont la précision était de 82 pour cent, ou par la méthode coopérationnelle transcription inverse suivie d'une réaction d'amplification génique (Co-RT-PCR), dont la précision était de 94 pour cent (Olmos *et al.*, 2007; Cambra *et al.*, 2008). La proportion de vrais négatifs (nombre de vrais négatifs diagnostiqués divisé par le nombre de végétaux sains) identifiés par la méthode DASI-ELISA en utilisant Madb 5B-IVIA était de 99,0 pour cent comparée à la méthode RT-PCR en temps réel utilisant un acide nucléique purifié (89,2 pour cent) ou des échantillons issus de végétaux présentant des taches (98,0 pour cent), ou à la méthode IC-RT-PCR (96,1 pour cent). Capote *et al.* (2009) ont aussi montré qu'il existait une probabilité égale à 98,8 pour cent qu'un résultat positif obtenu en hiver avec la méthode DASI-ELISA utilisant MAb 5B-IVIA soit un vrai positif. Il peut y avoir des variations entre différents lots d'antisérum, c'est pourquoi on devrait vérifier leur performance avant de les employer pour les analyses de routine.

L'antisérum monoclonal 5B-IVIA détecte toutes les sources de PPV testées avec la spécificité, la sensibilité et la fiabilité nécessaires (Cambra *et al.*, 1994; Cambra *et al.*, 2006a; Glasa *et al*., 2013; Chirkov *et al*., 2013; Chirkov *et al*., 2016). Plusieurs kits commerciaux utilisant des antisérums polyclonaux sont disponibles, ainsi que des données de validation (Gougherty *et al.*, 2015; OEPP, 2018a). Cambra *et al.* (2006a) ont toutefois montré que ces kits sont moins spécifiques et manquent de d'uniformité d'un lot à l'autre, raison pour laquelle on devrait procéder à leur validation avant de les employer. L'utilisation d'autres méthodes est recommandée lorsque les antisérums polyclonaux ont été utilisés pour une analyse et que l'ONPV exige un niveau de confiance plus élevé pour l'identification du PPV.

3.5.2 Analyse par dosage immunoenzymatique utilisant deux antisérums spécifiques (DAS-ELISA)

La méthode classique ou système biotine-streptavidine de DAS-ELISA sandwich à deux antisérums fait appel à des kits fondés sur l'utilisation spécifique de l'antisérum monoclonal 5B-IVIA ou sur des antisérums polyclonaux qui ont la capacité démontrée de détecter la plupart des

souches de PPV, y compris les types les plus largement disséminés D, M et Rec, sans réactions croisées avec d'autres virus ou du matériel végétal sain (Cambra *et al*., 2006a; Capote *et al*., 2009). L'analyse devrait être conduite conformément aux instructions du fabricant.

3.6 Détection et identification moléculaires

Les méthodes moléculaires comme la RT-PCR peuvent être plus coûteuses que les méthodes sérologiques, notamment pour des analyses à grande échelle. Cependant, les méthodes moléculaires, en particulier la méthode RT-PCR en temps réel, sont généralement plus sensibles que les méthodes sérologiques. L'utilisation de la méthode RT-PCR en temps réel évite par ailleurs d'avoir recours à un quelconque traitement post-amplification (par exemple l'électrophorèse sur gel). Elle est donc plus rapide et moins vulnérable aux contaminations (par l'ADN cible) que la méthode PCR classique.

À l'exception de la méthode IC-RT-PCR (pour laquelle il n'est pas nécessaire d'isoler l'ARN), l'extraction d'ARN devrait être effectuée en utilisant des protocoles validés. Les échantillons devraient être placés dans des sachets en plastique individuels afin d'éviter les contaminations croisées lors de l'extraction. En ce qui concerne la méthode RT-PCR en temps réel, des extraits de végétaux présentant des taches, des empreintes de sections de tissus ou des broyats de matériel végétal peuvent être immobilisés sur du papier buvard ou des membranes en nylon pour être analysés (Olmos *et al*., 2005; Osman et Rowhani, 2006; Capote *et al*., 2009). Il est recommandé d'analyser les échantillons présentant des taches ou les empreintes de tissus par RT-PCR en temps réel plutôt que par PCR classique, car elle est plus sensible.

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

3.6.1 Purification de l'ARN, immunocapture et synthèse de l'ADN complémentaire

3.6.1.1 Purification de l'ARN

La purification de l'ARN devrait être réalisée à l'aide de protocoles dûment validés ou d'un kit de purification de l'ARN, conformément aux instructions du fabricant. L'ARN extrait devrait être stocké à −70 °C (de préférence) ou −20 °C, pendant un an maximum, jusqu'à ce qu'il serve de matrice. On devrait stocker l'ARN en petites quantités afin d'éviter de le dégrader en le congelant et décongelant de manière répétée.

3.6.1.2 Immunocapture

L'immunocapture peut se substituer à la purification de l'ARN. Cette procédure nécessite la préparation d'un mélange d'antisérum dilué servant à sensibiliser les microtubes utilisés pour la réaction de transcription inverse. La Section 3.6.2 présente la procédure en détail.

3.6.1.3 Synthèse de l'ADN complémentaire

Compte tenu des problèmes liés à la préservation de l'ARN lors du stockage, il est recommandé de synthétiser l'ADN complémentaire (ADNc), celui-ci pouvant être conservé pendant de longues périodes et dans des conditions de température moins contraignantes que l'ARN.

3.6.2 Transcription inverse suivie d'une réaction d'amplification génique

Les amorces utilisées pour les méthodes RT-PCR décrites ci-dessous ont été validées et sont considérées comme des références pour la détection générale du PPV, même si d'autres amorces à large spectre peuvent être disponibles (Olmos *et al.*, 2006). Aucun faux positif n'a été obtenu dans les études qui décrivent l'élaboration et la validation de ces méthodes (Wetzel *et al*., 1991; Levy et Hadidi, 1994). Un

autre avantage des amorces de Wetzel *et al*. (1991) est qu'elles permettent également d'identifier les deux souches du PPV les plus fréquentes lorsqu'elles sont combinées à l'analyse du produit de 243 paires de bases (pb) en se fondant sur le polymorphisme de longueur des fragments de restriction.

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

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

P2 sens (5′-CAG ACT ACA GCC TCG CCA GA-3′)

soit celles de Levy et Hadidi (1994):

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

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

Le mélange réactif de 25 µl est composé comme suit: 1 µM de chaque amorce (P1 et P2 ou la paire d'amorces 3′NCR), 250 µM de dNTP, 1 unité de transcriptase inverse *Avian myeloblastosis virus* (AMV)[2], 0,5 unité de Taq DNA polymerase, 2,5 µl de tampon de Taq polymerase 10×, 1,5 mM de $MgCl_2$, Triton X-100 à 0,3 pour cent et 5 µl de matrice d'ARN. La réaction est effectuée avec les paramètres de thermocyclage suivants: 45 min à 42 °C, 2 min à 94 ºC, 40 cycles de 30 s à 94 °C, 30 s à 60 °C (amorces P1 et P2) ou 62 °C (amorces 3′NCR) et 60 s à 72 °C, suivis d'une phase d'élongation finale de 10 min à 72 °C. Les produits de la PCR sont analysés par électrophorèse sur gel. La paire d'amorces P1/P2 produit un amplicon de 243 pb et les amorces 3′NCR produisent un amplicon de 220 pb.

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

3.6.3 Immunocapture - transcription inverse suivie d'une réaction d'amplification génique

La phase d'immunocapture peut être effectuée selon Wetzel *et al*. (1992), en utilisant de la sève végétale extraite conformément à la Section 3.5, placée dans des tubes ou sachets en plastique individuels pour éviter la contamination. On peut avoir recours à n'importe quel antisérum validé comme il se doit. Cette analyse n'a été validée que pour les isolats des souches D et M, largement disséminées.

Une dilution (1 µg/ml) d'antisérums polyclonaux ou d'un antisérum monoclonal spécifique au PPV (par exemple 5B-IVIA) est préparée dans un tampon de carbonate dont le pH est 9,6. Des aliquotes de 100 µl d'antisérum dilué sont ajoutées dans des tubes PCR et incubées à 37 °C pendant 3 h. Les tubes sont ensuite lavés deux fois avec 150 µl de Tween PBS stérile (tampon de lavage), et rincés deux fois avec de l'eau exempte de RNase. L'extrait végétal (100 µl; voir Section 3.5) est clarifié par centrifugation (5 min à 15 500 *g*), et le surnageant est ajouté aux tubes PCR sensibilisés. Les tubes sont incubés pendant deux heures sur de la glace ou à 37 °C, puis lavés trois fois avec 150 µl de Tween PBS stérile. Le milieu réactif de la RT-PCR est préparé selon les modalités décrites dans la Section 3.6.2 en utilisant les amorces de Wetzel *et al.* (1991), et ajouté directement aux tubes PCR sensibilisés. L'amplification est réalisée selon les indications de la Section 3.6.2.

En général, la méthode IC-RT-PCR nécessite l'emploi d'antisérums spécifiques, mais les méthodes de fixation directe peuvent en rendre l'usage superflu. La méthode IC-RT-PCR utilisant l'antisérum monoclonal 5B-IVIA a été validée dans un examen comparatif DIAGPRO présentant une précision de 82 pour cent pour la détection du PPV (Olmos *et al.*, 2007; Cambra *et al.*, 2008). D'après Capote *et al.*

[2] L'emploi de noms de réactifs, produits chimiques ou matériel dans le présent protocole de diagnostic n'implique aucune approbation de ceux-ci à l'exclusion d'autres qui peuvent aussi convenir.

(2009), il existe une probabilité de 95,8 pour cent qu'un résultat positif obtenu en hiver avec la méthode IC-RT-PCR en utilisant l'antisérum monoclonal 5B-IVIA soit un vrai positif.

3.6.4 Méthode coopérationnelle transcription inverse suivie d'une réaction d'amplification génique

Les amorces RT-PCR utilisées dans cette méthode Co-RT-PCR sont celles de Wetzel *et al.* (1991; P1 et P2) et d'Olmos *et al.* (2002; P10 et P20):

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

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

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

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

Le mélange réactif de 25 µl est composé comme suit: 0,1 µM de chacune des amorces P1 et P2, 0,05 µM de chacune des amorces P10 et P20, 400 µM de dNTP, 2 unités de transcriptase inverse AMV, 1 unité de Taq DNA polymerase, 2,5 µl de tampon réactif 10 ×, 3 mM de $MgCl_2$, diméthyle sulfoxyde à 5 pour cent, Triton X-100 à 0,3 pour cent et 5 µl de matrice d'ARN. La RT-PCR est effectuée avec les paramètres de thermocyclage suivants: 45 min à 42 °C, 2 min à 94 °C, 60 cycles de 15 s à 94 °C, 15 s à 50 °C, 30 s à 72 °C, suivis d'une période d'élongation finale de 10 min à 72 °C.

La réaction RT-PCR est associée à une détection colorimétrique d'amplicons utilisant une sonde universelle à PPV étiquetée de 3′digoxygénine (DIG) (5′-TCG TTT ATT TGG CTT GGA TGG AA-DIG-3′). L'ADNc amplifié est dénaturé à 95 °C pendant 5 min et placé immédiatement sur de la glace. Une aliquote d'1 µl d'échantillon est placée sur une membrane en nylon. La membrane est ensuite séchée à température ambiante, puis soumise à une réticulation par UV dans un transilluminateur pendant 4 min à 254 nm. Pour la préhybridation, la membrane est placée dans un tube à hybridation à 60 °C pendant 1 h en utilisant un tampon d'hybridation normalisé. La solution est jetée, et l'hybridation est réalisée en mélangeant la sonde étiquetée 3DIG avec un tampon d'hybridation normalisé à une concentration finale de 10 pmol/ml, avant d'incuber pendant 2 h à 60 °C. La membrane est lavée deux fois pendant 15 min à la température ambiante avec de la solution de lavage concentrée 2 × et deux fois pendant 15 min à la température ambiante avec de la solution de lavage concentrée 0,5 ×. La membrane est équilibrée pendant 2 min dans un tampon de lavage puis mise à tremper pendant 30 min dans une solution de blocage stérilisée à 1 pour cent (1 g de réactif de blocage dissous dans 100 ml de tampon à l'acide maléique). La membrane est incubée à température ambiante avec des antisérums anti-DIG conjugués à la phosphatase alcaline à une concentration de 1:5 000 dans une solution de blocage à 1 pour cent (p/v) pendant 30 min. La membrane est ensuite lavée deux fois pendant 15 min avec un tampon de lavage et équilibrée pendant 2 min avec un tampon de détection (100 mM de Tris-HCl, 100 mM de NaCl, pH 9,5). On prépare la solution du substrat en mélangeant 45 µl d'une solution de NBT (75 mg/ml de sel de nitrobleu de tétrazolium dans du diméthylformamide à 70 pour cent (v/v)) et 35 µl d'une solution de BCIP (50 mg/ml de sel de 5-bromo-4chloro-3indolyl phosphate toluidine dans du diméthylformamide à 100 pour cent) dans 10 ml de tampon de détection. Après l'incubation avec le substrat, on interrompt la réaction en lavant à l'eau.

Olmos *et al.* (2002) ont montré que cette méthode est cent fois plus sensible que la RT-PCR selon Wetzel *et al.* (1991). Elle a été validée dans l'essai comparatif DIAGPRO, qui a établi sa précision à 94 pour cent (Olmos *et al.*, 2007; Cambra *et al.*, 2008).

3.6.5 Transcription inverse suivie d'une réaction d'amplification génique en temps réel

La RT-PCR en temps réel peut être effectuée avec TaqMan ou SYBR Green I[2]. Deux méthodes fondées sur TaqMan ont été décrites pour la détection universelle du PPV (Schneider *et al.*, 2004; Olmos *et al.*, 2005). Les amorces et la sonde TaqMan utilisées dans la première méthode sont celles étudiées par Schneider *et al.* (2004):

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

Amorce inverse (5′-TGA ATT CCA TAC CTT GGC ATG T-3′)

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

Le mélange réactif de 25 µl est composé comme suit: mélange réactif à 1 × (0,2 mM de chaque dNTP et 1,2 mM de $MgSO_4$), 200 nM de chacune des amorces directe et inverse, 100 nM de sonde TaqMan, 4,8 mM de $MgSO_4$, 0,5 µl de mélange RT/Platinum Taq (Superscript One-Step RT-PCR avec Platinum Taq DNA polymerase; Invitrogen)[2] et 5 µl de matrice d'ARN. La RT-PCR est effectuée avec les paramètres de thermocyclage suivants: 15 min à 52 °C, 5 min à 95 °C, et 60 cycles de 15 s à 95 °C et 30 s à 60 °C. Les produits de la PCR sont analysés en temps réel conformément aux instructions du fabricant du matériel.

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

Les amorces et la sonde TaqMan utilisées dans la deuxième méthode sont celles étudiées par Olmos *et al.* (2005):

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

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

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

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

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

Olmos *et al.* (2005) ont évaluée la méthode en utilisant trois isolats de PPV-D et trois isolats de PPV-M, et elle s'est avérée mille fois plus sensible que la méthode DASI-ELISA utilisant l'antisérum monoclonal 5B-IVIA. La proportion de vrais positifs (nombre de vrais positifs diagnostiqués par cette technique divisé par le nombre de végétaux infectés par le PPV) identifiés correctement par la RT-PCR en temps réel utilisant le TaqMan (Olmos *et al*., 2005) et un acide nucléique purifié était de 97,5 pour cent, chiffre à comparer avec ceux de la RT-PCR en temps réel utilisant des échantillons prélevés sur des végétaux présentant des taches (93,6 pour cent), de l'IC-RT-PCR (91,5 pour cent) ou de la méthode DASI-ELISA utilisant l'antisérum monoclonal 5B-IVIA (86,6 pour cent) (Capote *et al*., 2009).

Varga et James (2005) ont décrit une méthode SYBR Green I[2] pour la détection simultanée du PPV et l'identification des souches D et M:

P1 (5′-ACC GAG ACC ACT ACA CTC CC-3′)

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

PPV-FD (5′-TCA ACG ACA CCC GTA CGG GC-3′)

PPV-FM (5′-GGT GCA TCG AAA ACG GAA CG-3′)

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

Les amorces suivantes (Menzel *et al.*, 2002) peuvent être incluses à titre de témoins internes pour garantir la validité des résultats d'analyse:

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

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

On utilise un protocole RT-PCR en deux étapes. Le mélange pour la réaction RT est constitué comme suit: 2 µl de 10 µM d'amorce P1, 2 µl de 10 µM d'amorce Nad5-R, 4 µg d'ARN total et 5 µl d'eau. Le mélange est incubé à 72 °C pendant 5 min puis placé sur la glace. On ajoute ensuite: 4 µl de tampon premier brin 5 × (Invitrogen)[2], 2 µl de 0,1 M de dithiothréitol (DTT), 1 µl de 10 mM de dNTP, 0,5 µl de RNaseOUT (40 unités/µl) (Invitrogen)[2], 1 µl de Superscript II reverse transcriptase (Invitrogen)[2] et 2,5 µl d'eau. Le mélange est incubé à 42 °C pendant 60 min, puis à 99 °C pendant 5 min. Le milieu réactif de 24 µl de la PCR est composé comme suit: 400 nM d'amorce PPV-U, 350 nM d'amorce PPV-FM, 150 nM d'amorce PPV-FD, 200 nM d'amorce PPV-RR, 100 nM d'amorce Nad5-F, 100 nM d'amorce Nad5-R, 200 µM de dNTP, 2 mM de $MgCl_2$, tampon Karsai 1 × (Karsai *et al*., 2002), 1:42 000 de SYBR Green I[2] et 0,1 µl de Platinum Taq DNA high fidelity polymerase (Invitrogen)[2]. Le mélange réactif de la PCR et 1 µl d'ADNc dilué (1:4) sont ajoutés à un tube PCR stérile. La PCR est effectuée avec les paramètres de thermocyclage suivants: 2 min à 95 °C, et 39 cycles de 15 s à 95 °C et 60 s à 60 °C. L'analyse de la courbe de fusion est conduite par incubation à des températures de 60 °C à 95 °C par paliers de fusion de 0,1 °C/s et une courbe lissée en moyenne à 1 point. Dans les conditions décrites par Varga et James (2005), les températures de fusion de chaque produit sont les suivantes:

Détection universelle du PPV (fragment de 74 pb): 80,08-81,52 °C

Souches D (fragment de 114 pb): 84,3-84,43 °C

Souches M (fragment de 380 pb): 85,34-86,11 °C

Témoin interne (fragment de 181 pb): 82,45-82,63 °C.

Varga et James (2005) ont évalué leur méthode en utilisant des isolats de PPV-C, PPV-D, PPV-EA, PPV-M et une souche non caractérisée trouvée dans les espèces de *Nicotiana* et de *Prunus*.

4. Identification des souches

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

Compte tenu de la variabilité du PPV, des techniques autres que celles du séquençage ou certaines méthodes basées sur la PCR (voir ci-dessous) pourraient produire des résultats erronés avec un petit pourcentage d'isolats. Cependant, il est généralement possible de différencier les souches D et M de PPV en utilisant les méthodes sérologiques et moléculaires qui ont été décrites (Cambra *et al.*, 2006a; Candresse et Cambra, 2006; Capote *et al*., 2006). La présente norme ne fournit pas de techniques d'identification de souches comme An et T, car aucune méthode *ad hoc* n'a encore été validée et publiée, et parce que le nombre d'isolats caractérisés à ce jour est trop faible.

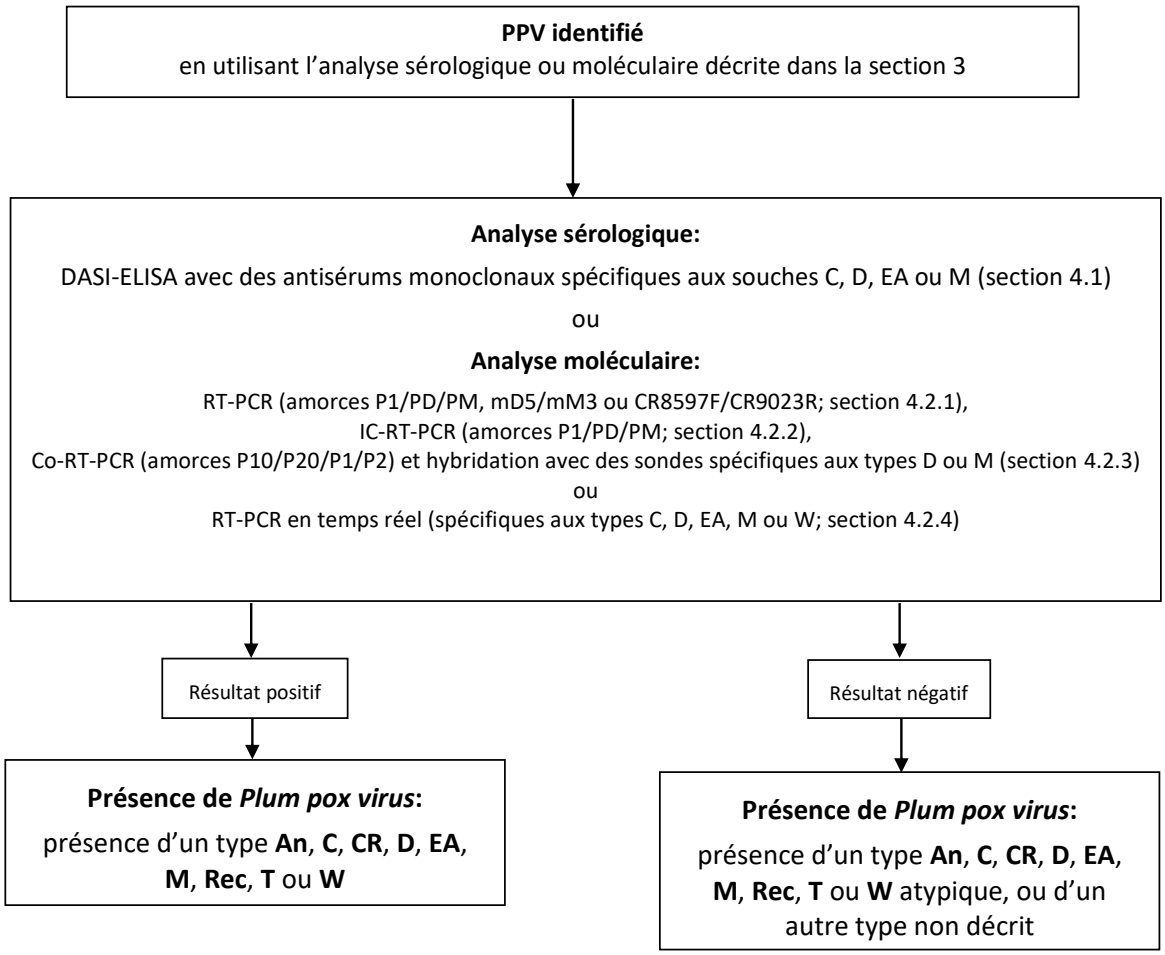

Figure 1. Étapes des méthodes d'identification des souches de *Plum pox virus*.

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

4.1 Identification sérologique des souches

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

Cette méthode a été validée dans l'examen comparatif DIAGPRO et présente une précision de 84 pour cent pour la détection du PPV-D et de 89 pour cent pour la détection du PPV-M (Olmos *et al.*, 2007; Cambra *et al.*, 2008). L'antisérum monoclonal 4D est spécifique au PPV-D mais il ne réagit pas avec tous les isolats du PPV-D. Par ailleurs, l'antisérum monoclonal AL utilisé pour la détection du PPV-M réagit avec des isolats appartenant aux souches M, Rec et T car ces groupes ont en commun la même séquence de la protéine d'enveloppe. Une analyse moléculaire est donc requise pour distinguer les souches M, Rec et T détectées en utilisant un antisérum monoclonal spécifique au type M.

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

4.2 Identification moléculaire des souches

4.2.1 Transcription inverse suivie d'une réaction d'amplification génique

Les souches PPV-D et PPV-M sont identifiées en utilisant les amorces décrites par Olmos *et al.* (1997):

P1 (5′-ACC GAG ACC ACT ACA CTC CC-3′)

PD (5′-CTT CAA CGA CAC CCG TAC GG-3′)

PM (5′-CTT CAA CAA CGC CTG TGC GT -3′)

Le mélange réactif de 25 µl est composé comme suit: 1 µM d'amorce P1, 1 µM d'amorce PD ou PM, 250 µM de dNTP, 1 unité de transcriptase inverse AMV (10 unités/l), 0,5 unité de Taq DNA polymerase (5 unités/l), 2,5 µl de tampon de Taq polymerase 10×, 1,5 mM de $MgCl_2$, 0,3 pour cent de Triton X-100, formamide à 2 pour cent et 5 µl de matrice d'ARN. La RT-PCR est effectuée avec les paramètres de thermocyclage suivants: 45 min à 42 °C, 2 min à 94 °C, 40 cycles de 30 s à 94 °C, 30 s à 60 °C, et 60 s à 72 °C, suivie d'une élongation finale de 10 min à 72 °C. Les produits de la PCR sont analysés par électrophorèse sur gel. Les paires d'amorces P1/PD et P1/PM produisent toutes les deux un amplicon de 198 pb. Olmos *et al.* (1997) ont évalué leur méthode sur six isolats de PPV-D et quatre isolats de PPV-M.

La RT-PCR en temps réel avec SYBR Green I[2] de Varga et James (2005), décrite en détail à la section 3.6.5, convient également pour l'identification des souches PPV-D et PPV-M.

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

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

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

Le mélange réactif de 25 µl est composé comme suit (adapté de Šubr *et al.*, 2004): 1 µM de chaque amorce, 250 µM de dNTP, 1 unité de transcriptase inverse AMV (10 unités/l), 0,5 unité de Taq DNA polymerase (5 unités/l), 2,5 µl de tampon Taq polymerase 10×, 2,5 mM de $MgCl_2$, Triton X-100 à 0,3 pour cent et 5 µl d'extrait d'ARN (voir la Section 3.6). La transcription inverse est mise en œuvre avec des amorces hexanucléotidiques de séquence aléatoire à 42 °C pendant 45 min (Glasa *et al*., 2002). La PCR est réalisée comment suit: étape initiale de dénaturation à 94 °C pendant 3 min, 35 cycles de 45 s à 94 °C, 30 s à 60 °C et 60 s à 72 °C, et étape d'élongation finale pendant 7 min à 72 °C (Šubr *et al.*, 2004). Le produit PCR de 605 pb est analysé par électrophorèse sur gel.

La souche PPV-CR est identifiée à l'aide des amorces CR8597F et CR9023R décrites par Glasa *et al.* (2013):

CR8597F (5′-ATG ATG TGA CGT TAG TGG AC-3′)

CR9023R (5′-TCG TGT GTT AGA CAG GTC AAC-3′)

On applique un protocole RT-PCR en deux étapes pour la détection spécifique des isolats de PPV-CR (Glasa *et al*., 2013). L'ADN complémentaire (ADNc) est synthétisé à partir d'extraits de l'ARN total (NucleoSpin RNA Plant Kit, Macherey-Nagel)[2] au moyen d'amorces hexamériques de séquence aléatoire et de transcriptase inverse AMV. Une aliquote d'ADNc est ensuite ajoutée au mélange réactif de la PCR contenant l'EmeraldAmp GT PCR Master Mix (TaKaRa Bio Inc.)[2]. La PCR est effectuée avec les paramètres de thermocyclage suivants: 60 s à 98 °C, 35 cycles de 30 s à 98 °C, 30 s à 55 °C et 30 s à 72 °C, puis une élongation finale de 5 min à 72 °C. Les produits de la PCR sont analysés par électrophorèse sur gel. Les amorces spécifiques au PPV-CR produisent un amplicon de 427 pb, et ciblent la région codante terminale 5′ du type CP. La spécificité des amorces à l'égard de PPV-CR a été validée avec des isolats des souches D, M, Rec, T, W, EA et C (Glasa *et al*., 2013).

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

La phase d'immunocapture devrait être réalisée selon les indications de la Section 3.6.3. Le mélange réactif de la PCR est ajouté directement aux tubes PCR sensibilisés. L'identification des types PPV-D et PPV-M est effectuée conformément aux indications de la Section 4.2.1.

4.2.3 Méthode coopérationnelle transcription inverse suivie d'une réaction d'amplification génique

L'identification des types PPV-D ou PPV-M devrait être effectuée selon les indications de la Section 3.6.4 en utilisant des sondes 3′ étiquetées avec de la DIG et spécifiques aux souches D et M (Olmos *et al.*, 2002):

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

Sonde spécifique au PPV-M: 5′-AAC GCC TGT GCG TGC ACG T-DIG-3′

Les étapes de préhybridation et d'hybridation se déroulent à 50 °C et comprennent des tampons de préhybridation et d'hybridation + formamide à 30 pour cent (pour l'identification du PPV-D) et + formamide à 50 pour cent (pour l'identification du PPV-M). La solution de blocage utilisée est à 2 pour cent (p/v).

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

Les types PPV-D et PPV-M sont spécifiquement identifiés en utilisant soit le fluorophore SYBR Green I[2] selon la méthode de Varga et James (2005) (voir la Section 3.6.5), soit la méthode TaqMan décrite par Capote *et al.* (2006).

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

Amorce PPV-MGB-F (5′-CAG ACT ACA GCC TCG CCA GA-3′)

Amorce PPV-MGB-R (5′-CTC AAT GCT GCT GCC TTC AT-3′)

Sonde MGB-D (5′- FAM-TTC AAC GAC ACC CGT A-MGB-3′)

Sonde MGB-M (5′-FAM-TTC AAC AAC GCC TGT G-MGB-3′)

Le mélange réactif de 25 µl est composé comme suit: 1 µM de chaque amorce, 150 nM de sonde MGB-D ou MGB-M FAM, TaqMan Universal PCR Master Mix 1 × (Applied Biosystems)[2], MultiScribe 1 × et RNase Inhibitor Mix 1 × (Applied Biosystems)[2] et 5 µl de matrice d'ARN (voir la Section 3.6). La RT-PCR est effectuée avec les paramètres de thermocyclage suivants: 30 min à 48 °C, 10 min à 95 °C, et 40 cycles de 15 s à 95 °C et 60 s à 60 °C. Les produits de la PCR sont analysés en temps réel conformément aux instructions du fabricant. Capote *et al.* (2006) ont évalué leur méthode sur 12 isolats de PPV-D et 12 isolats de PPV-M et sur 14 échantillons co-infectés par les deux souches.

Les souches PPV-C, PPV-EA et PPV-W sont spécifiquement identifiées en utilisant le fluorophore SYBR Green I[2] conformément à la méthode de Varga et James (2006a). Les amorces utilisées dans cette méthode sont les suivantes:

P1 (5′-ACC GAG ACC ACT ACA CTC CC-3′)

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

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

Les amorces suivantes (Menzel *et al.*, 2002) peuvent être incluses à titre de témoins internes pour garantir la validité des résultats d'analyse:

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

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

Le mélange réactif de 25 µl pour la RT-PCR est composé comme suit: 2,5 µl d'une dilution aqueuse à 1:10 (v/v) d'ARN extrait (voir la Section 3.6) et 22,5 µl de mélange principal. La composition de ce mélange principal est la suivante: 2,5 µl de tampon Karsai (Karsai *et al*., 2002); 0,5 µl de chacun des 5 µM d'amorce PPV-U, PPV-RR, Nad5R et Nad5F; 0,5 µl de 10 mM de dNTP; 1 µl de 50 mM de $MgCl_2$; 0,2 µl de RNaseOUT (40 unités/l ; Invitrogen)[2]; 0,1 µl de Superscript III (200 unités/l; Invitrogen)[2]; 0,1 µl de Platinum Taq DNA high fidelity polymerase (5 unités/l, Invitrogen)[2] et 1 µl de 1:5 000 (dans Tris-acide éthylène diamine tétracétique, pH 7,5) SYBR Green I[2] dans 16,1 µl d'eau. La réaction est effectuée avec les paramètres de thermocyclage suivants: 10 min à 50 °C, 2 min à 95 °C, et 29 cycles de 15 s à 95 °C et 60 s à 60 °C. L'analyse de la courbe de fusion est conduite par incubation à des températures de 60 °C à 95 °C par paliers de fusion de 0,1 °C/s et une courbe lissée en moyenne à 1 point. Dans les conditions décrites par Varga et James (2006a), les températures de fusion de chaque produit sont les suivantes:

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

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

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

Varga et James (2006a) ont évalué leur méthode en utilisant un isolat de chaque type: PPV-C, PPV-D, PPV-EA et PPV-W.

5. Témoins employés dans les analyses moléculaires

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

Acide nucléique témoin positif. Ce témoin sert à contrôler l'efficience de la méthode d'essai (sans tenir compte de l'extraction), et, s'agissant de la RT-PCR, de l'amplification. À ce titre, on peut utiliser la totalité de l'ARN du virus ou de la plante, ou des empreintes de matériel végétal infecté par le PPV sur une membrane. On devrait vérifier régulièrement les préparations d'ARN ou de PPV stockées pour s'assurer de la qualité des témoins à mesure que la durée d'entreposage s'allonge.

Témoin interne. Pour la RT-PCR, le protocole pourrait inclure l'ARN messager du gène mitochondrial *NADH dehydrogenase* 5 (*nad5*, Menzel *et al.*, 2002) à titre de témoin interne afin d'éliminer l'éventualité d'obtenir des faux négatifs dus à une mauvaise extraction ou à la dégradation de l'acide nucléique, ou encore à la présence d'inhibiteurs de RT-PCR.

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

Témoin positif de l'extraction. Ce témoin permet de vérifier que la qualité et la quantité de l'acide nucléique cible sont suffisantes pour la RT-PCR et que le virus visé est détectable. L'acide nucléique est extrait de tissus de l'hôte infectés par le PPV ou de tissus de végétaux ou d'insectes sains auxquels l'organisme cible a été inoculé.

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

Témoin d'extraction négatif. Ce témoin sert à contrôler l'absence de contamination pendant l'extraction de l'acide nucléique et l'absence de réactions croisées avec le tissu hôte. Il est constitué d'acide nucléique extrait à partir de tissus sains de l'hôte puis amplifié. Il est recommandé d'inclure

plusieurs témoins, dans un ordre aléatoire, quand on s'attend à ce qu'un grand nombre d'échantillons soient positifs.

En cas d'analyse par IC-RT-PCR sans extraction de nucléotide, on devrait inclure de la sève végétale issue d'un organisme réputé infecté par le PPV comme témoin positif, et de la sève prélevée sur une plante saine comme témoin négatif. Le protocole peut également comporter un témoin négatif de l'amplification. Ce témoin sert à écarter les faux positifs dus à une contamination au cours de la préparation du mélange réactif. Pour inclure un témoin négatif de l'amplification, on ajoute de l'eau de qualité PCR exempte de RNase employée pour préparer le mélange réactif à l'étape d'amplification.

6. Archives à conserver

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

Dans les cas où d'autres parties contractantes peuvent être concernées par les résultats du diagnostic, en particulier dans les cas de non-conformité (NIMP 13 – *Directives pour la notification de non-conformité et d'action d'urgence*) et lorsque le virus est identifié dans une zone pour la première fois, le matériel supplémentaire suivant devrait être conservé pendant au moins un an de manière à assurer une traçabilité complète:

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

7. Points de contact pour tout complément d'informations

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

Département de l'agriculture des États-Unis (USDA), Service de l'inspection de la santé des plantes et des animaux (APHIS), Protection phytosanitaire et quarantaine (PPQ), Science and Technology Beltsville Laboratory, Building 580 BARC-East, Powder Mill Road, Beltsville, MD 20705, États-Unis d'Amérique (Vessela Mavrodieva; courriel: vessela.a.mavrodieva@aphis.usda.gov; tél.: +1 3013139208; télécopie: +1 3023139232).

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

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

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

Instituto Valenciano de Investigaciones Agrarias (IVIA), Centro de Protección Vegetal y Biotecnología, Carretera Moncada-Náquera km 5, 46113 Moncada (Valencia), Espagne (Antonio Olmos, courriel: aolmos@ivia.es; tél.: +34 963424000; télécopie: +34 963424001).

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

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

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

8. Remerciements

Le présent protocole de diagnostic a été rédigé par M. Cambra, A. Olmos et N. Capote (IVIA, Espagne [voir la section précédente]), N. L. Africander (Department of Agriculture, Forestry and Fisheries, Stellenbosch, Afrique du Sud), L. Levy (USDA, États-Unis d'Amérique (voir la section précédente)), S. L. Lenardon (Instituto de Fitopatología y Fisiología Vegetal – Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria [IFFIVE-INTA], Córdoba, Argentine), G. Clover (Plant Health & Environment Laboratory, Ministry for Primary Industries, Auckland, Nouvelle-Zélande) et D. Wright (Plant Health Group, Central Science Laboratory, Sand Hutton, York, Royaume-Uni).

9. Références

La présente annexe peut renvoyer à des normes internationales pour les mesures phytosanitaires (NIMP). Les NIMP sont publiées sur le Portail phytosanitaire international (PPI), à la page: https://www.ippc.int/core-activities/standards-setting/ispms.

Barba, M., Hadidi, A., Candresse, T., et Cambra, M. 2011. *Plum pox virus. In*: A. Hadidi, M. Barba, T. Candresse et W. Jelkmann (sous la direction de). *Virus and virus-like diseases of pome and stone fruits*, Chap. 36. St. Paul, MN (États-Unis), APS Press. 428 pp.

Boscia, D., Zeramdini, H., Cambra, M., Potere, O., Gorris, M. T., Myrta, A., Di Terlizzi, B., et Savino, V. 1997. Production and characterization of a monoclonal antibody specific to the M serotype of *Plum pox potyvirus*. *European Journal of Plant Pathology*, 103: 477-480.

CABI. 2018. Crop protection compendium. Wallingford (Royaume-Uni), Centre for Agriculture and Biosciences International (CABI). Consultable à l'adresse http://www.cabi.org/cpc/ (dernière consultation le 14 février 2018).

Cambra, M., Asensio, M., Gorris, M. T., Pérez, E., Camarasa, E., García, J. A., Moya, J. J., López-Abella, D., Vela, C., et Sanz, A. 1994. Detection of *Plum pox potyvirus* using monoclonal antibodies to structural and non-structural proteins. *Bulletin OEPP/EOPP Bulletin*, 24: 569-577.

Cambra, M., Boscia, D., Myrta, A., Palkovics, L., Navrátil, M., Barba, M., Gorris, M. T., et Capote, N. 2006a. Detection and characterization of *Plum pox virus*: Serological methods. *Bulletin OEPP/EOPP Bulletin*, 36: 254-261.

Cambra, M., Capote, N., Myrta, A., et Llácer, G. 2006b. *Plum pox virus* and the estimated costs associated with sharka disease. *Bulletin OEPP/EOPP Bulletin*, 36: 202-204.

Cambra, M., Capote, N., Olmos, A., Bertolini, E., Gorris, M. T., Africander, N. L., Levy, L., Lenardon, S. L., Clover, G., et Wright, D. 2008. Proposal for a new international protocol for detection and identification of *Plum pox virus*. Validation of the techniques. *Acta Horticulturae*, 781: 181-192.

Candresse, T., et Cambra, M. 2006. Causal agent of sharka disease: Historical perspective and current status of *Plum pox virus* strains. *Bulletin OEPP/EOPP Bulletin*, 36: 239-246.

Capote, N., Bertolini, E., Olmos, A., Vidal, E., Martínez, M. C., et Cambra, M. 2009. Direct sample preparation methods for the detection of *Plum pox virus* by real-time RT-PCR. *International Microbiology*, 12: 1-6.

Capote, N., Gorris, M. T., Martínez, M. C., Asensio, M., Olmos, A., et Cambra, M. 2006. Interference between D and M types of *Plum pox virus* in Japanese plum assessed by specific monoclonal antibodies and quantitative real-time reverse transcription-polymerase chain reaction. *Phytopathology*, 96: 320-325.

Chirkov, S., Ivanov, P., et Sheveleva, A. 2013. Detection and partial molecular characterization of atypical *Plum pox virus* isolates from naturally infected sour cherry. *Archives of Virology*, 158: 1383-1387.

Chirkov, S., Ivanov, P., Sheveleva, A., Zakubanskiy, A., et Osipov, G. 2016. New highly divergent *Plum pox virus* isolates infecting sour cherry in Russia. *Virology*, 502: 56-62.

Damsteegt, V. D., Scorza, R., Stone, A. L., Schneider, W. L., Webb, K., Demuth, M., et Gildow, F. E. 2007. *Prunus* host range of *Plum pox virus* (PPV) in the United States by aphid and graft inoculation. *Plant Disease*, 91: 18-23.

Damsteegt, V. D., Waterworth, H. E., Mink, G. I., Howell, W. E., et Levy, L. 1997. *Prunus tomentosa* as a diagnostic host for detection of *Plum pox virus* and other *Prunus* viruses. *Plant Disease*, 81: 329-332.

Desvignes, J.-C. 1999. *Virus diseases of fruit trees*. Paris, Centre technique interprofessionnel des fruits et légumes (CTIFL) Centr'imprint. 202 pp.

OEPP (Organisation européenne et méditerranéenne pour la protection des plantes). 2004. Protocoles de diagnostic pour les organismes nuisibles réglementés: *Plum pox potyvirus*. PM 7/32(1). *Bulletin OEPP/EOPP Bulletin*, 34: 247-256.

OEPP (Organisation européenne et méditerranéenne pour la protection des plantes). 2006. Current status of *Plum pox virus* and sharka disease worldwide. *Bulletin OEPP/EOPP Bulletin*, 36: 205-218.

OEPP (Organisation européenne et méditerranéenne pour la protection des plantes). 2018a. Base de données de l'OEPP sur l'expertise en matière de diagnostic. Liste des données de validation. Consultable à l'adresse http://dc.eppo.int/validationlist.php (dernière consultation le 19 mars 2018).

OEPP (Organisation européenne et méditerranéenne pour la protection des plantes). 2018b. Base de données mondiale de l'OEPP. *Plum pox virus* (PPV000). Consultable à l'adresse https://gd.eppo.int/taxon/PPV000 (dernière consultation le 14 février 2018).

García, J. A., Glasa, M., Cambra, M., et Candresse, T. 2014. *Plum pox virus* and sharka: A model potyvirus and a major disease. *Molecular Plant Pathology*, 15: 226-241.

Gentit, P. 2006. Detection of *Plum pox virus*: Biological methods. *Bulletin OEPP/EOPP Bulletin*, 36: 251-253.

Glasa, M., Marie-Jeanne, V., Labonne, G., Šubr, Z., Kúdela, O., et Quiot, J.-B. 2002. A natural population of recombinant *Plum pox virus* is viable and competitive under field conditions. *European Journal of Plant Pathology*, 108: 843-853.

Glasa, M., Prikhodko, Y., Predajňa, L., Nagyová, A., Shneyder, Y., Zhivaeva, T., Šubr, Z., Cambra, M., et 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.

Gougherty A. V., Pazdernik K. T., Kaiser M. S., et Nutter Jr, F. W. 2015. Evaluation of sampling and testing efficiencies of *Plum pox virus* eradication programs in Pennsylvania and Ontario. *Plant Disease*, 99(9): 1247-1253.

Harju, V. A., Henry, C. M., Cambra, M., Janse, J., et Jeffries, C. 2000. Diagnostic protocols for organisms harmful to plants – DIAGPRO*. *Bulletin OEPP/EOPP Bulletin*, 30: 365-366.

Ilardi, V., et Tavazza, M. 2015. Biotechnological strategies and tools for *Plum pox virus* resistance: Trans-, intra-, cis-genesis, and beyond. *Frontiers in Plant Science*, 6: 379.

James, D., et Thompson, D. 2006. Hosts and symptoms of *Plum pox virus*: Ornamental and wild *Prunus* species. *Bulletin OEPP/EOPP Bulletin*, 36: 222-224.

James, D., Varga, A., et Sanderson, D. 2013. Genetic diversity of *Plum pox virus*: Strains, disease and related challenges for control. *Canadian Journal of Plant Pathology (Revue canadienne de phytopathologie)*, 35: 431-441.

Karsai, A., Müller, S., Platz, S., et Hauser, M.-T. 2002. Evaluation of a homemade SYBR® Green I reaction mixture for real-time PCR quantification of gene expression. *Biotechniques*, 32: 790-796.

Levy, L., et Hadidi, A. 1994. A simple and rapid method for processing tissue infected with *Plum pox potyvirus* for use with specific 3′ non-coding region RT-PCR assays. *Bulletin OEPP/EOPP Bulletin*, 24: 595-604.

Llácer, G., et Cambra, M. 2006. Hosts and symptoms of *Plum pox virus*: Fruiting *Prunus* species. *Bulletin OEPP/EOPP Bulletin*, 36: 219-221.

Menzel, W., Jelkmann, W., et Maiss E. 2002. Detection of four apple viruses by multiplex RT-PCR assays with coamplification of plant mRNA as internal control. *Journal of Virological Methods*, 99: 81-92.

Myrta, A., Potere, O., Boscia, D., Candresse, T., Cambra, M., et Savino, V. 1998. Production of a monoclonal antibody specific to the El Amar strain of *Plum pox virus*. *Acta Virologica*, 42: 248-250.

Myrta, A., Potere, O., Crescenzi, A., Nuzzaci, M., et Boscia, D. 2000. Properties of two monoclonal antibodies specific to cherry strain of *Plum pox virus*. *Journal of Plant Pathology*, 82 (suppl. 2): 95-101.

Olmos, A., Bertolini, E., et Cambra, M. 2002. Simultaneous and co-operational amplification (Co-PCR): A new concept for detection of plant viruses. *Journal of Virological Methods*, 106: 51-59.

Olmos, A., Bertolini, E., Gil, M., et Cambra, M. 2005. Real-time assay for quantitative detection of non-persistently transmitted *Plum pox virus* RNA targets in single aphids. *Journal of Virological Methods*, 128: 151-155.

Olmos, A., Cambra, M., Dasi, M. A., Candresse, T., Esteban, O., Gorris, M. T., et Asensio, M. 1997. Simultaneous detection and typing of *Plum pox potyvirus* (PPV) isolates by heminested-PCR and PCR-ELISA. *Journal of Virological Methods*, 68: 127-137.

Olmos, A., Capote, N., Bertolini, E., et Cambra, M. 2007. Molecular diagnostic methods for plant viruses. *In*: Z. K. Punja, S. DeBoer et H. Sanfacon (sous la direction de). *Biotechnology and plant disease management*, pp. 227-249. Wallingford (Royaume-Uni) et Cambridge (États-Unis), CABI. 574 pp.

Olmos, A., Capote, N., et Candresse, T. 2006. Detection and characterization of *Plum pox virus*: Molecular methods. *Bulletin OEPP/EOPP Bulletin*, 36: 262-266.

Osman, F., et Rowhani, A. 2006. Application of a spotting sample preparation technique for the detection of pathogens in woody plants by RT-PCR and real-time PCR (TaqMan). *Journal of Virological Methods*, 133: 130-136.

PaDIL (Pests and Diseases Image Library). 2018. Plant Biosecurity Toolbox. Consultable à l'adresse http://pbt.padil.gov.au/index.php?q=node/20&pbtID=136 (dernière consultation le 27 février 2018).

Palmisano, F., Boscia, D., Minafra, A., Myrta, A., et Candresse, T. 2012. An atypical Albanian isolate of *Plum pox virus* could be the progenitor of the Marcus strain. *Petria*, 22(3): 224.

Pasquini, G., et Barba, M. 2006. The question of seed transmissibility of *Plum pox virus*. *Bulletin OEPP/EOPP Bulletin*, 36: 287-292.

Rodamilans, B., León, D. S., Mühlberger, L., Candresse, T., Neumüller, M., Oliveros, J. C., et García, J. A. 2014. Transcriptomic analysis of *Prunus domestica* undergoing hypersensitive response to *Plum pox virus* infection. *PLOS One*, 9(6): e100477.

Schneider, W. L., Sherman, D. J., Stone, A. L., Damsteegt, V. D., et Frederick, R. D. 2004. Specific detection and quantification of *Plum pox virus* by real-time fluorescent reverse transcription-PCR. *Journal of Virological Methods*, 120: 97-105.

Šubr, Z., Pittnerova, S., et Glasa, M. 2004. A simplified RT-PCR-based detection of recombinant *Plum pox virus* isolates. *Acta Virologica*, 48: 173-176.

Ulubaş Serçe, Ç., Candresse, T., Svanella-Dumas, L., Krizbai, L., Gazel, M., et Çağlayan, K. 2009. Further characterization of a new recombinant group of *Plum pox virus* isolates, PPV-T, found in the Ankara province of Turkey. *Virus Research*, 142: 121-126.

Varga, A., et James, D. 2005. Detection and differentiation of *Plum pox virus* using real-time multiplex PCR with SYBR Green and melting curve analysis: A rapid method for strain typing. *Journal of Virological Methods*, 123: 213-220.

Varga, A., et James, D. 2006a. Real-time RT-PCR and SYBR Green I melting curve analysis for the identification of *Plum pox virus* strains C, EA, and W: Effect of amplicon size, melt rate, and dye translocation. *Journal of Virological Methods*, 132: 146-153.

Varga, A., et James, D. 2006b. Use of reverse transcription loop-mediated isothermal amplification for the detection of *Plum pox virus*. *Journal of Virological Methods*, 138: 184-190.

Wetzel, T., Candresse, T., Macquaire, G., Ravelonandro, M., et Dunez, J. 1992. A highly sensitive immunocapture polymerase chain reaction method for *Plum pox potyvirus* detection. *Journal of Virological Methods*, 39: 27-37.

Wetzel, T., Candresse, T., Ravelonandro, M., et Dunez, J. 1991. A polymerase chain reaction assay adapted to *Plum pox potyvirus* detection. *Journal of Virological Methods*, 33: 355-365.

Étapes de la publication

Ce récapitulatif ne fait pas officiellement partie de la norme.

2006-04 La CMP, à sa première session, ajoute le thème «Virus et phytoplasmes».

2008-09 Le Comité des normes (CN) approuve le projet et le soumet à une consultation par courriel.

2010-06 Consultation.

2011-10 Le CN, par décision électronique, recommande le projet à la CMP.

2012-03 La CMP, à sa septième session, adopte l'Annexe 2 de la NIMP 27.

NIMP 27. annexe 2. *Plum pox virus* (2012). Rome, Secrétariat de la CIPV, FAO.

2015-07 Le Secrétariat de la CIPV intègre des corrections de forme et révise le format des normes conformément à la procédure d'annulation et remplacement des anciennes normes approuvée par la CMP à sa dixième session (2015).

2016-11 Le CN ajoute le thème «Révision de la PD 2: *Plum pox virus*» au programme de travail.

2017-02 Le Groupe technique sur les protocoles de diagnostic (GTPD) examine et révise le projet de texte.

2017-06 Le CN approuve le projet de texte et le soumet à une consultation (2017_eSC_Nov_03).

2017-07 Première consultation.

2017-11 Le projet de texte est révisé par le responsable sur la base des observations reçues pendant la période de consultation.

2018-02 Le GTPD approuve le projet de texte et le soumet au CN pour approbation, en vue de son adoption.

2018-04 Le CN approuve la transmission du projet de texte pour la période de notification de 45 jours des PD (2018_eSC_May_09).

2018-07 Période de notification des PD (aucune objection soulevée).

2018-08 Le CN adopte le PD au nom de la CMP.

NIMP 27. annexe 2. *Plum pox virus* (2018). Rome, Secrétariat de la CIPV, FAO.

Dernière mise à jour des étapes de la publication: 2019-06

Cette page est intentionnellement laissée vierge

CIPV

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

Organization

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

Convention Internationale pour la Protection des Végétaux (CIPV)

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