



Détection du
Pepino mosaic virus (PepMV)
sur tomates
(feuilles, fruits et semences)

METHODE OFFICIELLE D'ANALYSE

Réf. : MOA 026 partie A version 2a



Droits de reproduction et Copyright

Le présent document est, sous sa forme électronique, mis gratuitement à la disposition des usagers du ministère chargé de l'agriculture en tant que méthode.

Le présent document est la propriété du ministère chargé de l'Agriculture, toute reproduction qu'elle soit totale ou partielle ne peut être effectuée qu'à la condition expresse que la source soit citée.

Dates de validité du présent document

Le présent document a valeur de méthode officielle à compter de sa date de publication indiquée ci-après. Il remplace alors *de facto* toute version antérieure.

Cependant, et sauf indication contraire explicite, la version précédente peut encore être utilisée pendant une durée maximale de 15 mois à compter de la date de publication de la nouvelle version, afin de tenir compte des cycles d'accréditation auxquels sont soumis les laboratoires de référence, agréés et reconnus officiellement.

Ce document étant susceptible d'évolution, il est de la responsabilité exclusive des utilisateurs de vérifier régulièrement qu'ils disposent bien de la dernière version.

Le tableau ci-dessous récapitule l'historique de la méthode.

n° méthode Numéro de la version	Consultation publique		Validité	
	Début	Fin	Début	Fin
VHs/04/06 Version a			Avril 2004	
MOA 026 consultation	Oct 2012	Fin déc. 2012	-	-
MOA 026 partie A version 1a	x	x	Janvier 2013	Octobre 2013 + 3 mois ¹
MOA026 version 2 consultation	Août 2013	Fin septembre 2013	-	-
MOA026 partie A version 2a	x	x	Octobre 2013	

¹ S'agissant d'une extension du périmètre de la méthode aux feuilles et aux fruits, la durée de validité de la version 1a est raccourcie à 3 mois à compter de la date d'officialisation de la nouvelle version.

TABLE DES MATIERES

PREAMBULE	5
Objet des méthodes officielles.....	5
Glossaire, abréviations et documents connexes	5
Limites imposées aux laboratoires agréés ou reconnus.....	5
Échantillonnage et échantillons	5
Modification des méthodes officielles.....	5
Considérations d'ordre métrologique.....	6
Obligations réglementaires et limites de responsabilité.....	6
Revue des méthodes officielles, amendement et modification	6
ORIGINE DE LA METHODE	7
PRINCIPALES MODIFICATIONS PAR RAPPORT A LA VERSION PRECEDENTE	7
Améliorations	7
Modifications majeures.....	7
INTRODUCTION	8
1. Présentation de l'organisme cible	8
1.1. L'agent pathogène.....	8
1.2. Biologie.....	8
1.3. Plantes-hôtes.....	8
1.4. Symptomatologie	9
2. Domaine d'application.....	9
2.1. Objets susceptibles d'être soumis à analyse.....	9
2.2. Limitations relatives aux objets susceptibles d'être soumis à analyse.....	9
2.2.1 Semences	9
2.2.2 Feuilles et fruits.....	9
2.3. Grandeur de l'objet soumis à analyse.....	10
2.3.1 Semences	10
2.3.2 Feuilles et fruits.....	10
3. Présentation schématique de la détection pour un échantillon donné	11
DESCRIPTION DE LA METHODE ELISA sur tomates	12
4. Produits et consommables	12
4.1. Tampons	12
4.2. Réactifs sérologiques.....	12
4.3. Autres consommables (le cas échéant).....	12
5. Appareillage et matériel	12
6. Contrôles et témoins.....	13
7. Etapes de l'analyse.....	13
7.1. Préparation des prises d'essai	13
7.1.1 Semences	13
7.1.2 Feuilles et fruits.....	14
7.2. Broyage de la prise d'essai	14
7.2.1 Semences	14
7.2.2 Feuilles et fruits.....	14
7.3. Déroulement du test ELISA.....	14
8. Résultats.....	15
8.1. Validation des résultats.....	15
8.2. Interprétation et formulation des résultats	15

ELIMINATION ET CONSERVATION DU MATERIEL VEGETAL	16
Elimination des matériels susceptibles d’être contaminants	16
Conservation des reliquats de matériels utilisés	16
REMERCIEMENTS	17
LISTE DES DOCUMENTS OFFICIELS APPELES PAR LA METHODE	17
BIBLIOGRAPHIE	18
Annexe 1	19
Annexe 2	20
Annexe 3	21

PREAMBULE

OBJET DES METHODES OFFICIELLES

Les méthodes officielles, au sens du décret 2006-7 du 4 Janvier 2006, sont les méthodes validées par le ministère chargé de l'agriculture pour l'utilisation dans le cadre des actes officiels relevant de ses services (plans de contrôle et de surveillance, contrôles à l'importation et à l'exportation...). Ces méthodes concernent le diagnostic, la détection ou l'identification d'organismes nuisibles aux cultures, d'organismes envahissants ou d'organismes génétiquement modifiés pour le domaine d'application précisé dans la méthode.

Ces méthodes servent de « méthodes publiées » au sens de la norme ISO 17025 pour l'accréditation des laboratoires par le COFRAC.

GLOSSAIRE, ABREVIATIONS ET DOCUMENTS CONNEXES

Afin de limiter les problèmes d'interprétation des termes employés, le vocabulaire utilisé dans les méthodes officielles du ministère chargé de l'agriculture est issu des normes, guides ou glossaires nationaux ou internationaux appropriés (AFNOR, ISO, CIPV, OEPP...).

Le glossaire GLO-001 reprend les principales définitions. L'attention des lecteurs est attirée sur le fait que les termes intégrés au glossaire ne sont, en règle générale, pas spécifiquement repérés dans le corps des méthodes officielles.

Certains documents (composition de milieux et tampons...) peuvent être communs à plusieurs méthodes officielles. Pour faciliter leur harmonisation et leur mise à jour, ils sont rassemblés dans des recueils spécifiques, considérés comme faisant partie intégrante des méthodes officielles. Les méthodes officielles appellent alors ces documents spécifiques en donnant leur code tel que repris dans les recueils.

LIMITES IMPOSEES AUX LABORATOIRES AGREES OU RECONNUS

Le ministère chargé de l'agriculture peut proposer ou imposer aux laboratoires, agréés ou reconnus, de stopper l'analyse à une certaine étape précisée dans la méthode officielle et, le cas échéant, de transmettre le matériel nécessaire à la poursuite de l'analyse dans un autre laboratoire, agréé ou de référence. Il est de la responsabilité de chaque laboratoire de veiller à suivre les contraintes définies par son périmètre d'agrément ou de reconnaissance et par les exigences du ministère.

ÉCHANTILLONNAGE ET ECHANTILLONS

L'échantillonnage, est de la responsabilité des préleveurs et ses modalités sont définies par ailleurs.

L'échantillon reçu est réputé être homogène en l'état de sa réception, par contre, il n'est pas forcément représentatif du lot d'où il provient et le laboratoire ne pourra en aucune façon attester du caractère représentatif au sens de la statistique.

Le laboratoire peut être amené à séparer l'échantillon reçu en prises d'essai pour les besoins de l'analyse, il s'agit alors d'une simple division et non d'un réel sous-échantillonnage au sens de la statistique, et le laboratoire n'a pas de ce fait à être accrédité pour l'échantillonnage.

MODIFICATION DES METHODES OFFICIELLES

Sur le principe, seules les méthodes officielles peuvent être utilisées dans le cas d'analyses officielles, sans aucune modification. Néanmoins, et afin que les laboratoires puissent mieux utiliser leurs ressources et valoriser leur expérience, la possibilité leur est laissée d'utiliser des méthodes dérivées ou alternatives, ou de remplacer un réactif-clé à la condition expresse que le LNR ait validé la modification.

Une méthode dérivée résulte de modifications de portées limitées appliquées à la méthode officielle (par exemple, remplacement d'une procédure d'extraction de l'ADN par une autre, utilisation d'un appareil de préparation de l'échantillon différent de celui prévu dans la méthode officielle...).

Une méthode alternative s'appuie sur des principes ou des technologies différentes de celles décrites dans les méthodes officielles, il s'agit réellement d'une autre méthode.

Un réactif-clé (ou critique) est un réactif directement impliqué dans la reconnaissance des organismes recherchés ou dont la qualité peut affecter directement le résultat.

Les laboratoires agréés évaluent les conséquences de la modification (d'une méthode par une autre ou d'un réactif-clé par un autre) conformément aux prescriptions du LNR et transmettent le dossier d'évaluation correspondant au LNR pour validation de cette modification.

Toute autre modification (qui n'a pas d'incidence prévisible sur le résultat) doit néanmoins faire l'objet d'une documentation apportant la preuve qu'elle n'interfère effectivement pas avec le résultat. Cette documentation est tenue en permanence à disposition du LNR.

Le ministère chargé de l'agriculture peut souhaiter faire profiter l'ensemble des laboratoires réalisant des analyses officielles des avantages que peuvent représenter les méthodes dérivées et alternatives qui lui sont proposées, en intégrant certaines modifications à l'occasion d'une révision de la méthode officielle. Le laboratoire à l'origine de l'amélioration est, dans ce cas, cité dans la méthode officielle.

CONSIDERATIONS D'ORDRE METROLOGIQUE

Afin d'alléger la lecture des méthodes officielles, seules les valeurs cibles des grandeurs mesurées sont indiquées dans le corps du texte, en unités du système international. Les erreurs maximales tolérées (EMT) à prendre en considération sont données dans le tableau ci-après (dans le cas contraire, des spécifications sont précisées dans le texte des méthodes).

Volume	volume < à 10 mL : EMT = ± 10 % Volume ≥ à 10 mL : EMT = ± 5 %
Masse	EMT = 10 %
pH	EMT = 0,3 u
Température	incubateur : EMT = ± 3 °C réfrigérateur : 5 °C et EMT = ± 4 °C congélateur : ≤ -18 °C congélateur froid intense : ≤ -65 °C
Longueur	EMT = 10 %
Temps	EMT = 10 %

OBLIGATIONS REGLEMENTAIRES ET LIMITES DE RESPONSABILITE

La mise en œuvre des méthodes officielles s'applique sans préjudice des réglementations françaises et communautaires ou des exigences normatives auxquelles doivent se soumettre les laboratoires (circulation, détention, manipulation des organismes nuisibles, détention des substances réglementées, bonnes pratiques de laboratoire, santé et sécurité au travail, mesures de confinement, agrément des laboratoires, déclaration à la commission de génie génétique ...).

Dans un certain nombre de cas, les méthodes peuvent appeler l'attention des lecteurs sur des risques potentiels liés par exemple à la dangerosité de certains produits ou à la rupture du confinement. Ces mises en garde ne sont destinées qu'à aider les lecteurs et n'ont vocation ni à être exhaustives, ni à se substituer aux exigences réglementaires existantes.

Toute personne physique ou morale constatant la présence, sur un végétal, une partie de végétal ou un produit d'origine végétale, d'un organisme nuisible réglementé a l'obligation d'en faire déclaration auprès des services régionaux de l'alimentation des directions régionales de l'agriculture, de l'alimentation et de la forêt.

Les conditions de mise en œuvre des méthodes officielles ainsi que la qualité des réactifs-clé utilisés sont susceptibles de modifier la qualité des résultats obtenus avec les méthodes officielles. Ces deux derniers aspects relèvent de la responsabilité des laboratoires utilisateurs.

Le ministère chargé de l'agriculture ne saurait être tenu pour responsable dans le cas de mises en œuvre inadéquates, volontaires ou non des méthodes officielles.

REVUE DES METHODES OFFICIELLES, AMENDEMENT ET MODIFICATION

Les méthodes officielles sont revues périodiquement à l'initiative du ministère chargé de l'agriculture ou du laboratoire national de référence. A chaque modification, le code de la méthode change comme indiqué au chapitre « principales modifications par rapport à la version précédente ».

Les usagers sont également invités à faire connaître dans les meilleurs délais leurs remarques, commentaires et suggestions, et à signaler toute erreur, omission ou imprécision constatées.

ORIGINE DE LA METHODE

Cette méthode officielle d'analyse est directement liée à la "**Directive Générale : Techniques qualitatives immuno-enzymatiques de type ELISA : DAS et dérivés**" (référence : MOA 008) qui est disponible auprès du laboratoire de référence. La méthode officielle ne peut être appliquée qu'en respectant la MOA.

La présente méthode permet de détecter le *Pepino mosaic virus* (PepMV), virus de la mosaïque du pépino, sur feuilles, fruits et semences non traitées de tomates (*Solanum lycopersicum*).

Le PepMV a un statut d'organisme de quarantaine sur semences pour l'Union Européenne, par décision communautaire du 27 février 2004 (2004/200/CE). De ce fait, les laboratoires utilisant cette méthode devront avoir été agréés selon la directive 2008/61 CE pour la manipulation des organismes de quarantaine.

La présente méthode est une actualisation de la méthode VHs/04/06 version a, de détection du virus de la mosaïque du pépino (PepMV) sur semences de tomates, par technique sérologique ELISA.

La MOA 026 a été revue et mise en forme par l'équipe du Laboratoire de virologie de la station d'Angers du Laboratoire de la Santé des Végétaux :

Le travail de relecture et de révision a été effectué par l'unité « Développement de Méthodes et Analyses » du Laboratoire de la Santé des Végétaux.

PRINCIPALES MODIFICATIONS PAR RAPPORT A LA VERSION PRECEDENTE

Une modification majeure concerne des parties clé ou le fond même de la méthode officielle, dont la prise en compte est susceptible d'améliorer significativement la portée ou le résultat de la méthode d'analyse. Sa prise en compte peut nécessiter des adaptations importantes ayant un impact sur l'accréditation du laboratoire, c'est pourquoi un délai est en règle générale accordé pour que les laboratoires de référence, agréés ou officiellement reconnus l'intègrent au premier audit d'accréditation. Dans certains cas, clairement précisés, une modification peut nécessiter une prise en compte immédiate par les laboratoires. En cas de modification majeure, le numéro de version est incrémenté d'une unité (exemple: la version v1c devient v2a).

Une amélioration est une modification mineure, qui apporte des précisions utiles ou pratiques, reformule les propos pour les rendre plus clairs ou plus précis, rectifie des erreurs bénignes. Elle n'est pas de nature à remettre en cause l'accréditation du laboratoire. Elle doit être prise en compte dans les meilleurs délais par les laboratoires de référence, agréés et officiellement reconnus. En cas d'amélioration, le numéro de version reste le même mais la lettre associée est incrémentée (exemple: la version v1c devient v1d).

AMELIORATIONS

La présente version comporte une amélioration majeure en intégrant dans le schéma de détection un test de confirmation (méthode moléculaire interne effectuée par le LNR) pour l'(les) échantillon(s) indéterminé(s) en ELISA.

Les améliorations de pure forme (y compris les corrections grammaticales ou orthographiques) ne sont pas reprises dans cette synthèse des améliorations.

MODIFICATIONS MAJEURES

La présente version comporte une modification majeure : Modification du tampon de broyage (tampon d'extraction) pour l'ELISA.

Le périmètre de la version 2a étend son périmètre d'application aux feuilles et les fruits en plus des semences.

INTRODUCTION

Le virus de la mosaïque du pépino (PepMV) appartient à la famille des *Alphaflexiviridae* et au genre *Potexvirus*. Décrit pour la première fois au Pérou en 1974, sur tomate, c'est un virus hautement contagieux, qui affecte de façon significative la qualité du fruit et la croissance de la plante. Ce virus est également présent dans la semence de tomates.

1. Présentation de l'organisme cible

1.1. L'agent pathogène

Nom : *Pepino mosaic virus*

Synonyme : mosaïque du Pépino

Acronym : PepMV

Position taxonomique : Viruses ; Tymovirales ; *Alphaflexiviridae* ; *Potexvirus*

EPPO computer code : PEPMV0

Catégorie phytosanitaire : Liste d'alerte OEPP depuis 2000; En France, il fait l'objet de mesures de lutte obligatoire (arrêté du 21 mars 2003) Décision communautaire 2004/200/EC.

Le *Pepino mosaic virus* (PepMV) est un virus filamenteux de la famille des *flexiviridae*, appartenant au genre *Potexvirus*, dont les particules font environ 700 nm de longueur et 11 nm de largeur. Il possède un ARN positif monocaténaire (ssRNA) de 6450 nucléotides. Le génome du PepMV code pour 5 protéines (Cotillon *et al.*, 2002).

En Europe, il a été trouvé en 1999 pour la première fois sur tomate (*Solanum lycopersicum*), dans des serres hollandaises et britanniques, puis l'année suivante en France, en Allemagne et en Espagne. Depuis, le virus a également été identifié sur tomate dans de nombreux pays européens ainsi qu'aux Etats-Unis, au Canada, et au Chili.

Dans la classification phylogénétique actuelle des différents isolats du PepMV, on distingue 4 génotypes ou souches, à savoir Europe (EU), Pérou (LP), Chili 2 (Ch2) et US1 (Ch1/US1) (Ling, 2007; Hanssen *et al.*, 2008). La souche CH2 est aujourd'hui majoritairement présente sur le territoire européen. Elle comprend 2 variants (99.4 % identité) qui se distinguent par la sévérité des symptômes qu'ils induisent : CH2-mild et CH2-aggressive (Hanssen *et al.*, 2009) : En France, le virus est très répandu dans les Pyrénées-Orientales et en région PACA depuis 2007 (E Verdin, Communication personnelle). Récemment une recombinaison de l'ARN a été signalée à partir d'isolats Belges du PepMV retrouvés en co-infection sur des plants de tomates (Hanssen *et al.*, 2008). Dans cette étude 2 génotypes du PepMV, EU et Ch2, en co-infection, ont généré dans des conditions naturelles des particules virales recombinantes. D'autres génomes du PepMV incluant LP, EU et US ont été également trouvés en co-infection sur des plants de tomates (Pagán *et al.*, 2006). La présence de ces particules virales recombinantes soulève un problème dans la gestion des cultures car on note l'apparition de dégâts plus importants allant jusqu'à la nécrose de plants (Beata Hasiów-Jaroszewska *et al.*, 2010).

1.2. Biologie

Depuis quelques années, le PepMV est devenu l'une des maladies entraînant des pertes économiques significatives en Europe et Amérique (Van der Vlugt *et al.*, 2000).

Aucun vecteur n'a été identifié et c'est un virus hautement infectieux par simple contact de plante à plante et par voie mécanique.

La transmission par semences peut se produire à un taux faible (0,026 %) (Van der Vlugt *et al.*, 2000) lorsque la semence n'est pas correctement désinfectée (eau de javel). Le virus étant présent sur l'enveloppe externe de la semence et non dans l'endosperme (Krinkels, 2001), il est facilement accessible au traitement de désinfection.

1.3. Plantes-hôtes

Le PepMV a été naturellement isolé à partir de plants infectés tels que le melon poire (*Solanum muricatum*) et la tomate (*Solanum lycopersicum*) dans le monde entier. L'infection d'autres solanacées telles que l'aubergine, le tabac et la pomme de terre ne se produit que dans des conditions d'inoculation artificielle. L'indexage peut être réalisé sur des plantes sensibles telles que : *Datura metel* et *D. stramonium* ; *Nicotiana benthamiana*, *N. glutinosa*, *N. occidentalis*. ; *Solanum lycopersicum* et *Solanum spp.*

1.4. Symptomatologie

Très fréquemment, le virus peut infecter un plant de tomates sans induire de symptômes visibles. En outre, l'expression des symptômes varie selon les cultivars de tomates et les conditions de culture. Parfois, l'expression des symptômes débute par une déformation et un aspect cloqué des feuilles occasionnellement suivi par des chloroses inter-nervaires ou des mosaïques modérées. Le symptôme le plus caractéristique est l'apparition de taches angulaires de couleur jaune vif sur les feuilles. Quelques fois, des déformations mineures, similaires aux dommages hormonaux ou à des arrêts de croissance, apparaissent au point végétatif («tête d'ortie»). Plus rarement, les plantes infectées montrent des lésions nécrotiques, taches ou stries, sur les feuilles et les tiges. Sur les tiges florales, elles peuvent provoquer l'avortement des fleurs. Occasionnellement, les plantes sont nanisées et déformées. L'épiderme des fruits de certaines variétés montre des décolorations irrégulières ou des marbrures.

2. Domaine d'application.

2.1. Objets susceptibles d'être soumis à analyse.

La méthode s'applique à des feuilles, des fruits ou des semences non traitées de tomates. Pour les feuilles ou fruits de plantes hôtes ils peuvent être utilisés frais ou congelés après réception. De façon préférentielle des feuilles ou des fruits frais sont utilisés.

Le reliquat de matériel végétal doit être conservé de façon appropriée en fonction de sa nature et autant que de besoin, notamment en cas de tests complémentaires ou d'envoi prévu au laboratoire assurant l'étape de confirmation.

Remarque : Pour les feuilles ou fruits qui auront été congelés après réception, les sachets de matériel végétal doivent être conservés congelés à ≤ -18 °C ou de façon préférentielle à ≤ -65 °C avant analyse.

2.2. Limitations relatives aux objets susceptibles d'être soumis à analyse

L'analyse permet d'obtenir un résultat qualitatif sur des échantillons potentiellement infectés par le PepMV, de feuilles, fruits ou semences non traitées de tomates.

2.2.1 Semences

Les semences de tomates doivent n'avoir subi aucun traitement particulier (exemple : enrobage ou pelliculage) susceptible de diminuer la sensibilité ou la spécificité du test¹.

*Remarque : Dans le cas de l'importation d'un lot de semences traitées, **ce dernier doit être accompagné d'une fraction de semences du même lot non traitées permettant la réalisation de l'analyse²**. Une impossibilité d'analyse sera mentionnée dans le cas contraire.*

2.2.2 Feuilles et fruits

Le matériel végétal doit être dans un état de fraîcheur approprié : feuilles sans nécrose ou signe de sénescence.

Dans les cas contraires, le laboratoire émet des réserves sur tout résultat d'analyse négatif en précisant l'état dégradé de l'échantillon à la réception au laboratoire. Si les échantillons arrivent dans un état très dégradé, le laboratoire peut refuser l'analyse. Le refus d'analyse doit être motivé et doit être notifié au client dans les plus brefs délais.

Remarque : Les échantillons congelés après réception doivent être frais sans nécroses ou signe de sénescence. Une fois congelés, ils ne doivent pas avoir subi de cycles de congélation/décongélation et présenter un état de fraîcheur approprié : absence de cristaux, de tissus nécrosés.

² Voir note de service DGAL/SDQP/N2009-8192 du 9 juillet 2009

2.3. Grandeur de l'objet soumis à analyse.

2.3.1 Semences

La taille de l'échantillon pour la recherche de la mosaïque du Pélino (PepMV) doit être adaptée à la taille du lot³ et sera considéré comme homogène. Dans tous les cas, la prise d'essai soumise à l'analyse doit comporter l'équivalent de 100 graines (cf. paragraphe 7.1) dans 5 mL de tampon phosphate.

Quelque soit la taille de l'échantillon reçu, le laboratoire prendra autant de prises d'essai que nécessaire par multiple entier d'équivalent de 100 graines dans la limite de multiples d'équivalent de 1000 ou 500 graines reçues. Pour exemple et selon les recommandations de l'ISTA (International Seed Testing Association), le nombre de prise d'essai pour un échantillon d'un lot de semences de tomates pourra être réalisé selon le tableau suivant :

Poids du lot	Poids de l'échantillon	Nombre de prises d'essai
Inférieur à 600 g	1 % du lot avec un échantillon minimum d'équivalent de 1000 graines (soit 3,3 g +/- 0,5)	10
De 600 g et inférieur à 10 Kg	2500 graines (soit 7,5 g +/- 1,5 g)	25
De 10 kg à 10 000 Kg	5000 graines (soit 15 g +/- 2 g)	50

Au-delà de 10 000 Kg, le lot devra être subdivisé par tranche de 10 000 Kg.

A réception, les échantillons de semences, peuvent être conservés à température ambiante ou à 4 °C à l'abri de l'humidité.

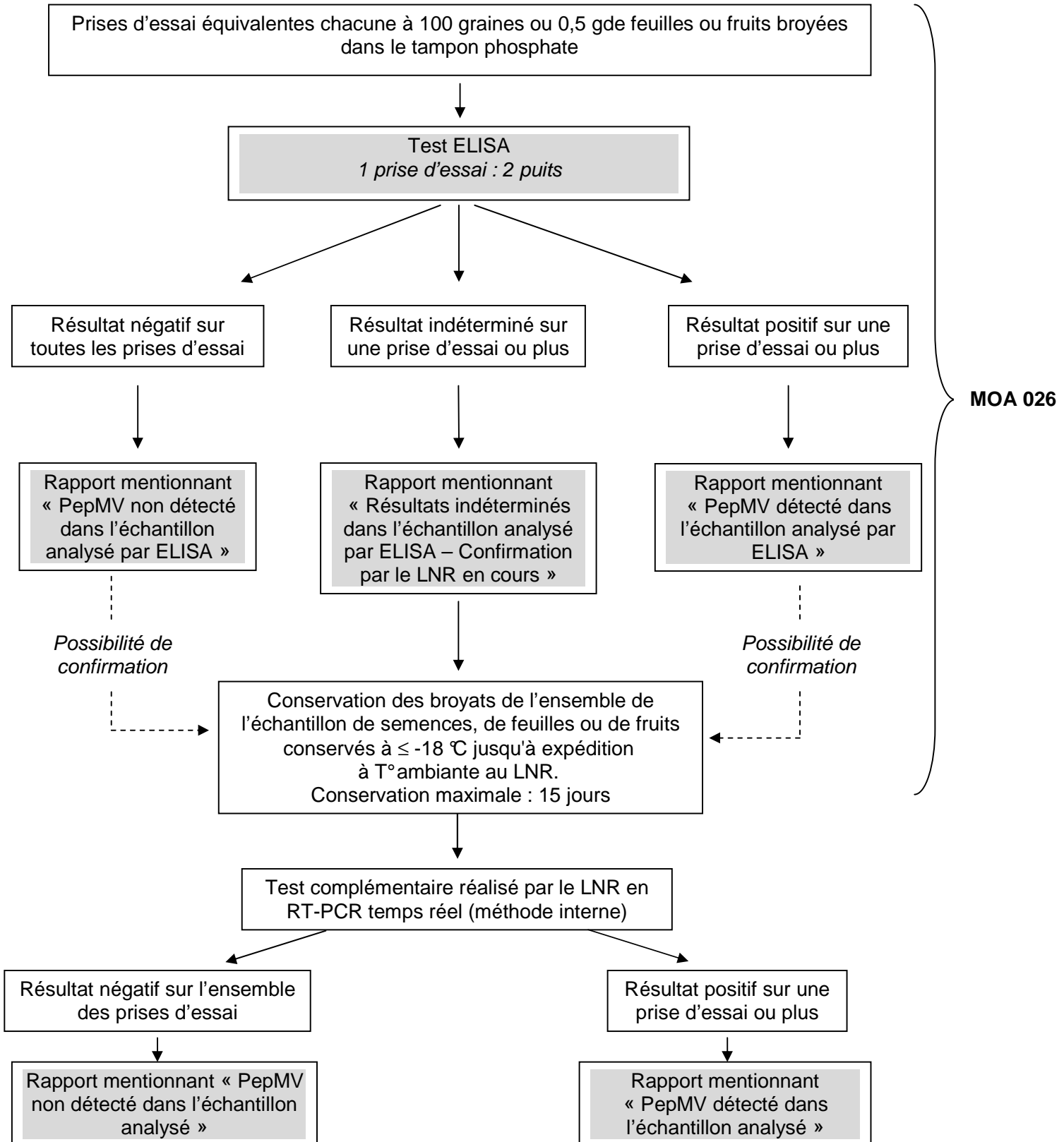
2.3.2 Feuilles et fruits

Pour chaque échantillon, la prise d'essai est constituée d'une fraction de 0,5 g de matériel végétal. Prévoir si possible d'autres fractions dans l'éventualité d'analyses complémentaires.

En deçà de la quantité de matériel végétal nécessaire, des réserves sont émises quant au résultat d'analyse si ce dernier est négatif.

³ Voir pour exemple la note de service DGAL/SDQPV/N2008-8291 du 20 novembre 2008

3. Présentation schématique de la détection pour un échantillon donné



DESCRIPTION DE LA METHODE ELISA SUR TOMATES

4. Produits et consommables

Les recommandations des fournisseurs, concernant les conditions de stockage avant utilisation, sont suivies, ainsi que la conservation en cours d'utilisation. A défaut le laboratoire définit les conditions qu'il juge optimales.

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.

4.1. Tampons

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

- tampon de coating ;
- tampon de lavage ;
- tampon de broyage ou d'extraction « phosphate » ;
- tampon de conjugué ;
- tampon de substrat.

Pour le tampon d'extraction, il est impératif d'utiliser la recette indiquée en annexe 1.

Pour les autres tampons, l'utilisation de ceux préconisés par le fournisseur de réactifs sérologiques est fortement recommandée. Toutefois, il est possible pour le laboratoire de fabriquer et d'utiliser ceux communs à d'autres méthodes ELISA. Pour cela, il se référera au répertoire des recettes en vigueur (REP-001 – Annexe 2) et apportera les éléments nécessaires validant l'équivalence de ses tampons avec ceux préconisés par le fournisseur.

4.2. Réactifs sérologiques

Le laboratoire utilise des réactifs spécifiques du PepMV. Ces réactifs doivent pouvoir détecter l'ensemble des souches du PepMV.

Un conseil pour le choix du fournisseur de réactifs sérologiques peut être apporté par le laboratoire de référence ; il est donc recommandé de contacter ce laboratoire avant chaque campagne d'analyse.

Dans tous les cas, le laboratoire ne peut pas utiliser un réactif testé puis déclaré non satisfaisant par le laboratoire de référence.

Rappel : les *antisera* doivent faire l'objet de contrôles et vérifications tels que décrits dans la MOA 008.

4.3. Autres consommables (le cas échéant)

- **Plaques de microtitration (et couvercles)**: Utiliser des plaques de microtitration à fond plat de type NUNC Immunosorbent Maxisorp[®] certifiées ou de toute autre marque assurant une qualité de réaction au moins équivalente.
- **Substrat** : à diluer dans du tampon de substrat selon les recommandations du fournisseur. Pour un marquage à la phosphatase alcaline (le plus fréquent), le substrat est le p-nitrophényl phosphate.
- **Produit désinfectant** : désinfection des surfaces de travail et du matériel par un produit virucide (eau de Javel à 0,36 % de chlore actif par exemple cf. annexe 3)

5. Appareillage et matériel

Pour la mise en œuvre de cette méthode, le laboratoire dispose des appareils décrits dans la méthode officielle d'analyse « Techniques ELISA » (MOA 008).

Différents systèmes de broyage peuvent être utilisés, en fonction de l'appareillage disponible au laboratoire.

Le laboratoire doit disposer d'un dispositif permettant de parfaitement écraser la totalité des graines de chaque prise d'essai, sans percer les sachets de broyage. L'usage d'une presse pneumatique est vivement conseillé à cette fin. Il est également conseillé de disposer d'une pompe à vide pour aspirer les broyats ou d'un système de traitement des effluents.

Pour les feuilles et fruits un simple broyeur à billes est nécessaire.

Le laboratoire doit avoir une procédure d'élimination des déchets permettant l'inactivation du virus éventuellement présent dans les déchets de manipulation. Ainsi, si les déchets solides ne sont pas incinérés après enlèvement par une société spécialisée, le laboratoire doit disposer d'un autoclave.

6. Contrôles et témoins

Il est obligatoire d'intégrer des références de lecture sur chaque plaque de microtitration. Conformément aux exigences de la méthode officielle d'analyse « Techniques ELISA » (MOA 008), ces références sont constituées :

- **des témoins sains (TS)** : il s'agit de références " matrices identiques à l'échantillon et non infectées ".

Il convient **d'utiliser des témoins sains de même nature (semences, feuilles ou fruits) et de même espèce (tomates)** que les matrices à analyser.

Les témoins sains (TS) doivent être constitués par des prises d'essai de 100 graines non infectées par le virus ou 0,5 g de feuilles ou fruits et sont traitées en parallèle et dans les mêmes conditions que les prises d'essai à analyser.

Ils sont au minimum de 2, à raison de 2 puits par témoin. L'utilisation de 3 témoins (soit 6 puits) est recommandée.

Ces témoins sains servent à déterminer les seuils de positivité et de négativité.

- **des témoins malades (TM)** : il s'agit de références qui assurent un déroulement correct de la manipulation.

Pour chaque série d'analyses, on peut utiliser des prises d'essai de semences contaminées (échantillons de référence naturellement contaminés) ou des témoins commerciaux positifs (lyophilisés, glycérolés...) à préparer selon les recommandations du fournisseur.

- **des témoins tampon (TP)** : Il s'agit d'un essai blanc constitué uniquement du tampon de broyage pour contrôler le bruit de fond du tampon de broyage et vérifier que celui-ci est indemne de toute contamination susceptible de modifier les résultats d'analyses.

- **des témoins substrat** (appelés également puits substrat).

Une colonne des plaques de microtitration est remplie d'eau de qualité analytique à chaque étape de dépôt, excepté à la dernière étape où elle est remplie de la solution de substrat. Elle permet de faire le "blanc" ou zéro optique sur le spectrophotomètre du lecteur de plaques de microtitration.

Si l'appareil de lecture ne permet pas de produire automatiquement des valeurs d'absorbances corrigées, la moyenne des absorbances des puits substrat est soustraite de l'absorbance brute des essais.

L'utilisation de ces références sert à valider le bon déroulement des différentes étapes de l'analyse ainsi que les résultats obtenus sur les différentes microplaques. Leur observation et/ou lecture et conformité à l'attendu sont un préalable à l'interprétation des résultats obtenus sur les échantillons soumis à analyse.

7. Etapes de l'analyse

Précaution : le PepMV se transmettant par simple contact, il est fortement conseillé de porter des gants pour manipuler les échantillons, et de les changer entre chaque échantillon.

A défaut, se désinfecter soigneusement les mains en début et en fin de manipulation de chaque échantillon.

Les surfaces de travail doivent être désinfectées entre chaque échantillon, ou bien protégées par du papier ou du plastique renouvelé entre chaque échantillon

7.1. Préparation des prises d'essai

La méthode sérologique permet, dans les conditions d'application décrites ci-après, de détecter une seule graine contaminée par le PepMV dans une prise d'essai équivalente à 100 graines ou de détecter le PepMV dans 0,5 g de feuilles ou fruits infectés. Chaque prise d'essai est déposée dans un sac de broyage bien étanche, de préférence comportant une gaze de séparation synthétique permettant de filtrer le broyat.

7.1.1 Semences

Cette préparation peut être effectuée de deux manières: avec un compteur de graines ou par pesée.

- **Préparation avec un compteur de graines**

Elle ne peut s'appliquer que pour des graines bien nettoyées et individualisées. Elle nécessite une désinfection de l'ensemble du dispositif (trémie et conduit) entre chaque échantillon (cf. § 9.). Chaque prise d'essai est obtenue par comptage de 100 graines par l'appareil.

- **Préparation par pesée**

Elle s'effectue sur une surface de travail propre et non contaminée par le PepMV, de préférence sur une feuille de papier.

En l'absence du poids signalé, la masse moyenne de 100 graines est obtenue de la manière suivante :

- En s'aidant d'un scalpel dont la lame est désinfectée entre chaque prise d'essai, compter 100 graines puis les peser.
- Refaire ensuite deux autres comptages de 100 graines et deux pesées. Calculer la moyenne **m** des trois masses obtenues ; les autres prises d'essai sont obtenues par pesée d'une masse **m** de graines.

7.1.2 Feuilles et fruits

Pour les feuilles et fruits, prélever et mélanger des feuilles et/ou partie de fruits présentant si possible des symptômes. En l'absence de symptômes, faire des prélèvements de façon aléatoire. A partir de cet ensemble homogène, prélever 0,5 g de matériel végétal et les déposer dans un sachet de broyage.

7.2. Broyage de la prise d'essai

L'objectif du broyage de la prise d'essai est de faciliter la libération d'un maximum de particules virales. Vérifier par palpation l'intégralité du broyage et conserver les broyats à 5 °C en attendant de les déposer.

Remarque : Après le test ELISA, les prises d'essai broyées sont placées à ≤ -18 °C pour un envoi éventuel en cas de test de confirmation.

7.2.1 Semences

Jusqu'à leur préparation, les prises d'essai doivent être conservées à température ambiante.

Avant broyage, ajouter 5 mL de tampon d'extraction « Phosphate » (cf. Annexe 1) dans chaque sachet. Afin de favoriser la libération des particules virales, le broyat peut être effectué 1 à 6 heures avant le dépôt. Ce broyage est réalisé de préférence avec une presse pneumatique ou avec tout autre système permettant d'obtenir une qualité de broyage équivalente sans percer les sachets.

7.2.2 Feuilles et fruits

Jusqu'à leur préparation, les prises d'essai doivent être conservées à 5 °C ou congelées à ≤ -18 °C.

Avant broyage, ajouter 4,5 mL de tampon d'extraction « Phosphate » (cf. Annexe 1) dans chaque sachet. Broyer les sachets un par un jusqu'à obtenir un « jus » homogène.

7.3. Déroulement du test ELISA

Suivre en priorité le protocole d'analyse du fournisseur de réactifs (étapes, durées d'incubation, volumes, dilutions). Les recommandations de la MOA 008 doivent impérativement être suivies.

Établir soigneusement le plan de distribution (plan de plaque) et d'identification des extraits. A titre indicatif, un plan de plaque est donné en Annexe 2.

Des témoins sains supplémentaires peuvent éventuellement remplacer une ou plusieurs prises d'essai.

Chaque prise d'essai est au moins répété 1 fois soit 2 puits par prise d'essai à raison de 100 µL ou 200 µL par puits (selon les recommandations du fournisseur de l'antisérum).

Il est recommandé de ne pas utiliser les puits de bordure, sauf si le laboratoire peut prouver l'absence d'effet bordure.

Lecture : pour le marqueur phosphatase alcaline et le p-nitrophényl phosphate comme substrat, la lecture d'absorbance se fait à 405 nm. Plusieurs lectures peuvent être réalisées à des temps différents.

A titre d'exemple, s'il n'est pas prévu par le fournisseur de réactifs pour bloquer la réaction enzymatique, les lectures peuvent être faites à environ 30 mn, 1h et 2h, voire plus si nécessaire (réaction lente) après ajout de la solution de substrat.

La lecture de référence utilisée pour calculer les seuils peut être celle effectuée à environ 2h.

Remarques : Pour éviter au cours du temps des variations non contrôlées des conditions environnementales pouvant avoir une incidence sur le déroulement des différentes réactions, il est prudent de réaliser ces opérations dans un environnement (température, hygrométrie, luminosité,...) défini et constant. L'utilisation de couvercles sur les microplaques et leur maintien à l'obscurité à des températures contrôlées durant toutes les phases d'incubation peuvent être des mesures préventives y contribuant. Toutes ces étapes simples doivent être menées avec soin et rigueur, notamment les opérations de lavage.

8. Résultats

8.1. Validation des résultats

Les résultats ne sont interprétables qu'à partir du moment où tous les critères de validation des microplaques présentés dans la méthode officielle d'analyse « Techniques ELISA » (MOA 008) sont vérifiés.

8.2. Interprétation et formulation des résultats

En absence de recommandations explicites de la part du fournisseur de réactifs, l'interprétation des résultats se pratique sur la base du calcul de deux seuils, notés S1 et S2 :

- S1 = « Moyenne absorbances corrigées des TS » x 2
- S2 = « Moyenne absorbances corrigées des TS » x 3

Absorbance corrigée = absorbance brute – absorbance substrat (Zéro optique effectué sur les puits substrats).

L'analyse étant qualitative, trois catégories de résultats sont définies :

- **Positif** : la moyenne des valeurs de l'absorbance de la prise d'essai est supérieure ou égale à S2.
Le résultat est : « PepMV détecté dans l'échantillon analysé selon la technique ELISA ».
Le reliquat peut être transmis au LNR pour confirmation (selon la demande du client).
- **Indéterminé** : la moyenne des valeurs de l'absorbance de la prise d'essai est comprise dans l'intervalle S1-S2.
Le résultat est : « la méthode ne permet pas de déterminer le statut de l'échantillon, le reliquat est transmis au LNR pour confirmation ».
- **Négatif** : la moyenne des valeurs de l'absorbance de la prise d'essai est inférieure à S1.
Le résultat est : « PepMV non détecté dans l'échantillon analysé selon la technique ELISA ».
Le reliquat peut être transmis au LNR pour confirmation (selon la demande du client).

Remarque : Le recours à un mode de calcul différent peut-être envisagé dans certaines situations. Dans ce cas, il faut prendre contact avec le laboratoire national de référence.

ELIMINATION ET CONSERVATION DU MATERIEL VEGETAL

ELIMINATION DES MATERIELS SUSCEPTIBLES D'ETRE CONTAMINANTS

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.

Il est recommandé que les consommables ayant été en contact avec le matériel végétal infecté (ou de statut indéterminé) soient autoclavés ou incinérés par le laboratoire ou une société spécialisée (sachets de broyage, tubes, plaques de microtitration...).

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

CONSERVATION DES RELIQUATS DE MATERIELS UTILISES

Les reliquats des échantillons analysés sont conservés, afin de pouvoir procéder à un renouvellement de l'analyse et/ou à une analyse de confirmation.

Pour une nouvelle analyse ELISA ou une confirmation par méthode moléculaire, la conservation à -18 °C est privilégiée dans le délai de 15 jours.

Remarque : sauf mention contraire explicite ou impossibilité technique avérée, les laboratoires doivent conserver les reliquats pertinents (nature, quantité et qualité) de matériel soumis à analyse, dans des conditions appropriées garantissant leur intégrité, jusqu'à au moins le dixième jour ouvrable suivant l'envoi au demandeur d'un rapport d'analyse concluant à la non mise en évidence de l'organisme recherché. 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.

Dans le cas d'un résultat autre que la non mise en évidence de l'organisme recherché, et sauf indications plus précises dans la méthode, l'ensemble des reliquats pertinents doit être conservé pendant une durée minimale de 12 mois, sauf pour les parties éventuellement transmises à un autre laboratoire agréé ou de référence, à qui est alors transférée la charge de conservation des reliquats. Le laboratoire national de référence peut demander que tout ou partie de ces reliquats lui soient transmis, aux frais des laboratoires agréés ou reconnus, dans le cadre des missions qui lui sont confiées.

A l'issue de toute période de conservation, tout fragment de matériel végétal infecté (ou de statut indéterminé) doit être détruit par autoclavage ou autre moyen inactivant les virus.

REMERCIEMENTS

Le laboratoire de la santé des végétaux de l'Anses remercie les anciens collègues du LNPV, unité de virologie des plantes herbacées, station de Montfavet, qui avaient évalué et rédigé la méthode VHs/04/06 version a de détection du virus de la mosaïque du Pépino (PepMV) sur semences de tomates par la méthode ELISA.

Le laboratoire de la santé des végétaux de l'Anses remercie également M. Eric Verdin (INRA, Montfavet) pour la revue critique du travail d'évaluation de cette méthode.

LISTE DES DOCUMENTS OFFICIELS APPELES PAR LA METHODE

Référence	Titre
REP 001	Répertoire des recettes
GLO 001	Glossaire général et technique
MOA 008	TECHNIQUES ELISA Bactériologie / Virologie
VHs/04/06 ver a	Méthode Officielle de détection du PepMV sur semences par ELISA
	Rapport d'évaluation de la comparaison de méthodes RT PCR et RT QPCR avec la méthode référence ELISA pour la détection de <i>Pepino mosaic virus</i> (PepMV) - septembre 2012

Cadre réglementaire

Décret 2006-7 du 4 janvier 2006 relatif aux laboratoires nationaux de référence, ainsi qu'à l'agrément et à la reconnaissance des laboratoires d'analyses dans le domaine de la santé publique vétérinaire et de la protection des végétaux, et modifiant le code rural

Arrêté ministériel du 19 décembre 2007 fixant les conditions générales d'agrément des laboratoires d'analyses dans le domaine de la santé publique vétérinaire et de la protection des végétaux

BIBLIOGRAPHIE

- Alfaro-Fernández A., *et al.* (2009). Simultaneous detection and identification of Pepino mosaic virus (PepMV) isolates by multiplex one-step RT-PCR. *Eur. J. Plant Pathol.* 125: 143-158.
- Cotillon A.C., *et al.* (2002). Complete nucleotide sequence of the genomic RNA of a French isolate of *Pepino mosaic virus* (PepMV). *Archive of virology*, 147: 2231-2238.
- Hanssen I.M., *et al.* (2008). Genetic characterization of Pepino mosaic virus isolates from Belgian greenhouse tomatoes reveals genetic recombination. *Eur. J. Plant Pathol.* 121, 131–146.
- Hanssen I.M., *et al.* (2009). Pepino mosaic virus isolates and differential symptomatology in tomato. *Plant Pathol.* 58, 450-460.
- Ling K.S., *et al.* (2007a). Molecular characterization of two *Pepino mosaic virus*; variants from imported tomato seed reveals high levels of sequence identity between Chilean and US isolates. *Virus Genes* 34: 1–8.
- Ling K.S., *et al.* (2007b). Development of a one-step immunocapture real-time TaqMan RT-PCR assay for the broad spectrum detection of *Pepino mosaic virus*. *J. Virol. Methods*, 144, 65–72.
- Ling K.S., *et al.* (2008a). Genetic composition of *Pepino mosaic virus* population in North American greenhouse tomatoes. *Plant Dis.* 92, 1683–1688.
- Ling K.S., *et al.* (2008b). *Pepino mosaic virus* on tomato seed: virus location and mechanical transmission. *Plant Dis.* 92, 1701–1705.
- Van der Vlugt R.A.A., *et al.* (2002). Identification and characterization of *Pepino mosaic potexvirus* in tomato. *Bulletin OEPP/EPPO Bulletin* 32, 503-508.
- Van der Vlugt R.A.A., *et al.* (2007). Pepeira project n°044189 : *Pepino mosaic virus*: epidemiology, economic impact and pest risk analysis. *Final report*.

ANNEXE 1

1. Tampon de broyage ou extraction (Tampon « phosphate » 0,1M)

Préparer séparément

- Solution A : 0,1 M de Na_2HPO_4 (14,2 g pour 1 L d'eau distillée)
- Solution B : 0,1 M de KH_2PO_4 (13,6 g pour 1 L d'eau distillée)

Ajuster la solution A à pH 7,2 avec la solution B

Conservation à +5 °C pendant 1 mois sans autoclavage

2. Tampon de rinçage

(PBS 1X + 0,05 % Tween 20)

Cf. MOA REP 001

3. Tampon de coating

(Na_2CO_3 15 mM, NaHCO_3 35 mM, pH 9,6)

Cf. MOA REP 001

4. Tampon conjugué

(PBS 1X + 0,05 % Tween 20 + 2 % PVP K25 ou K40 + 0,2 % Ovalbumine ou BSA)

Cf. MOA REP 001

5. Tampon de substrat

(Diéthanolamine 10 %, pH 9,8)

Cf. MOA REP 001

ANNEXE 2

Plan de plaque

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	eau	eau	eau	eau	eau	eau	eau	eau	eau	eau	eau	eau
B	Substrat	TS1	3	6	9	12	15	18	21	24	TS2	eau
C	Substrat	TS1	3	6	9	12	15	18	21	24	TS2	eau
D	Substrat	1	4	7	10	13	16	19	22	25	Tp	eau
E	Substrat	1	4	7	10	13	16	19	22	25	Tp	eau
F	Substrat	2	5	8	11	14	17	20	23	Tp	TM1	eau
G	Substrat	2	5	8	11	14	17	20	23	Tp	TM2	eau
H	eau	eau	eau	eau	eau	eau	eau	eau	eau	eau	eau	eau

- TS1 et TS2 : témoins sains (éventuellement, TS2 = TS1)
- TM1 : témoin malade
- TM2 : témoin malade (éventuellement TM1 = TM2)
- Tp : témoin tampon d'extraction
- 1 à 25 : prises d'essai

Aux étapes du coating, dépôt d'échantillon et conjugué, les lignes A et H et les colonnes 1 et 12 sont remplies d'eau distillée, osmosée ou permutée.

Remarque : Pour ces trois étapes, il est possible d'utiliser un film de scellage adhésif

A l'étape du substrat, seuls les puits 1B à 1G inclus seront remplis du substrat.

ANNEXE 3

Préparation d'eau de Javel à 0,36 % de chlore actif

Attention : vérifier la date de validité des solutions d'hypochlorite de sodium utilisées, ce produit ayant une durée d'efficacité optimale limitée. Celle-ci est inversement proportionnelle au pourcentage de chlore actif.

Une solution d'hypochlorite de sodium (eau de Javel) à 0,36 % de chlore actif, soit 1,2° chlorométrique, est obtenue en diluant au 30^{ème} une solution à 9,6 % de chlore actif (soit 36° chlorométrique).

Ainsi, il faut ajouter 7,25 L d'eau froide (du robinet ou éventuellement permutée) au contenu d'un berlingot commercial (250 mL à 9,6 % c.a.) pour obtenir 7,5 L d'une solution à 0,36 % de chlore actif.

Pour toute demande à caractère scientifique et technique relative à ce document, le point de contact national désigné par le ministère chargé de l'agriculture est le laboratoire national de référence concerné :

ANSES
Laboratoire de la santé des végétaux
Unité de Bactériologie, Virologie et détection des OGM
Station d'Angers
7, rue Jean Dixméras
49044 ANGERS
lsv@anses.fr

Ce document est édité par :

**Ministère de l'agriculture, de l'alimentation, de la pêche,
de la ruralité et de l'aménagement du territoire.**

Direction générale de l'alimentation
Service de la prévention des risques sanitaires de la production primaire
Sous-direction de la qualité et de la protection des végétaux
251, rue de Vaugirard, 75732 PARIS Cedex 15
www.agriculture.gouv.fr

Après de qui toute autre correspondance peut être adressée.