

## Méthode d'analyse en santé des végétaux

**RÉFÉRENCE : ANSES/LSV/MA066- Version 01**

Décembre 2020

# Détection du tomato brown rugose fruit virus (ToBRFV) par RT-PCR en temps réel sur plantes hôtes

**Laboratoire de la santé des végétaux**

Laboratoire national de référence « Autres virus »



## Historique de la méthode

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

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

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

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

Version	Nature des modifications (majeure/mineure)	Date	Principales modifications
v1		Décembre 2020	Version initiale

Cette méthode a fait l'objet d'une consultation du 24 novembre 2020 au 09 décembre 2020 sur le site internet de l'agence, notamment auprès des laboratoires agréés français.



## Avant-propos

La présente méthode a été développée par :

**Anses - Laboratoire de la santé des végétaux– Unité bactériologie, virologie et OGM**

Laboratoire National de Référence : Mandat « Autres virus »

Adresse : 7 rue Jean Dixméras

49044 Angers CEDEX 01

Contact : lsv.ubvo@anses.fr

La présente méthode a été initialement optimisée, évaluée et validée par l'équipe de virologie de l'unité de bactériologie, virologie, OGM au sein du Laboratoire de la Santé des Végétaux (rapports de caractérisation et de validation de la méthode interne version 01 en date du mois d'octobre 2020).

Le travail de relecture a été effectué par l'Unité de Coordination de la Référence du Laboratoire de la Santé des Végétaux ainsi que par Thomas BALDWIN et Valérie GRIMAUULT du GEVES (Groupe d'Etude et de contrôle des Variétés Et des Semences).



## Sommaire

<b>Avant-propos</b> .....	<b>3</b>
<b>Introduction</b> .....	<b>6</b>
<b>Avertissements et précautions de sécurité</b> .....	<b>7</b>
<b>1. Objet et domaine d'application</b> .....	<b>8</b>
<b>2. Documents de référence</b> .....	<b>8</b>
<b>3. Termes, sigles et définitions</b> .....	<b>8</b>
<b>4. Principe de la méthode</b> .....	<b>9</b>
<b>5. Réactifs</b> .....	<b>10</b>
5.1 Eau.....	10
5.2 Kits d'extraction d'ARN .....	10
5.3 Oligonucléotides .....	10
5.4 Kit d'amplification de RT-PCR en temps réel .....	11
5.5 Autres consommables à usage unique .....	11
5.6 Contrôles et témoins.....	11
<b>6. Appareillage et matériels</b> .....	<b>12</b>
<b>7. Échantillons</b> .....	<b>14</b>
7.1 Conditions d'acceptation des échantillons .....	14
7.2 Conservation des échantillons avant analyse .....	14
7.3 Conservation des échantillons ou reliquats après analyse .....	15
<b>8. Mode opératoire</b> .....	<b>15</b>
8.1 Préparation des échantillons pour analyse .....	15
8.1.1 Préparation des échantillons de feuilles ou de fruits .....	16
8.1.2 Préparation des échantillons de semences.....	16
8.2 Broyage des échantillons.....	17
8.2.1 Broyage de feuilles ou de fruits.....	17
8.2.2 Broyage de semences .....	17
8.3 Extraction de l'ARN total .....	18
8.4 Test de détection par RT-PCR en temps réel .....	19
<b>9 Résultats</b> .....	<b>20</b>
9.1 Cut-off .....	20



9.2 Contrôle de la validité des résultats .....	20
9.3 Calculs et expression des résultats .....	21
9.3.1 Interprétation résultats du contrôle interne .....	21
9.3.2 Interprétation des résultats ToBRFV .....	21
<b>10 Caractéristiques de performance de la méthode.....</b>	<b>23</b>
<b>Annexe 1 Protocole d'extraction d'ARN Kit RNeasy® plant mini Kit QIAGEN©.....</b>	<b>24</b>
<b>Annexe 2 –Protocole d'extraction d'ARN kit Maxwell® HT simplyRNA PROMEGA© .....</b>	<b>25</b>
<b>Annexe 3 –Tampon Lyse Froid kit Maxwell® HT simplyRNA PROMEGA©.....</b>	<b>26</b>
<b>Annexe 4 –Préparation plaques kit Maxwell® HT simplyRNA PROMEGA© .....</b>	<b>26</b>
<b>Annexe 5 –Préparation du tampon PBS (Phosphate Buffered Saline) pH7,2 - 7,4 .....</b>	<b>26</b>
<b>Bibliographie.....</b>	<b>28</b>

### Table des tableaux

TABLEAU 1 : ERREURS MAXIMALES TOLEREES	13
TABLEAU 2: CONDITIONS DE CONSERVATION DES ECHANTILLONS FEUILLES, FRUITS ET SEMENCES.	15
TABLEAU 3 : PRELEVEMENT MINIMUM (NOMBRE DE SEMENCES) ET VOLUME DE BROYAGE SUIVANT LE KIT D'EXTRACTION UTILISE.	16
TABLEAU 4 : VOLUME DE BROYAT POUR L'EXTRACTION D'ARN	18
TABLEAU 5 : COMPOSITION DU MELANGE REACTIONNEL	19
TABLEAU 6 : PARAMETRES D'AMPLIFICATION	19
TABLEAU 7 : REGLES D'INTERPRETATION DES RESULTATS DE RT-PCR POUR LA CIBLE TOBRFV.	21
TABLEAU 8 : REGLE DE DECISION DU STATUT DE L'ECHANTILLON (VALABLE POUR SEMENCES).	22
TABLEAU 9 : SYNTHESE ET VALIDATION DES RESULTATS DES CARACTERISTIQUES TECHNIQUES.	23



## Introduction

Le tomato brown rugose fruit virus ou virus du fruit rugueux brun de la tomate (ToBRFV) a été observé pour la première fois en 2014 et 2015 sur des tomates en Israël et en Jordanie, et des foyers sont récemment apparus en Chine, au Mexique, aux États-Unis et dans plusieurs pays membres de l'OEPP (OEPP, 2020).

La tomate (*Solanum lycopersicum*) et le poivron\* (*Capsicum spp.*) sont les seules plantes cultivées à être des hôtes naturels confirmés du ToBRFV (Luria et al., 2017; NAPPO, 2018; Salem et al., 2016, 2019; Panno et al., 2020). Le statut d'hôte de l'aubergine (*Solanum melongena*) n'est pas confirmé.

Le virus est une source de préoccupation majeure pour les producteurs de tomates et de poivrons car il réduit la vigueur de la plante, entraîne des pertes de rendement et les symptômes du virus rendent les fruits invendables. Le virus peut également être présent dans les feuilles et les fruits de plantes asymptomatiques et sur semences.

Les principaux symptômes du ToBRFV comprennent une déformation foliaire, avec jaunissement et mosaïque, tandis que les fruits sont déformés avec des zones jaunes ou brunes, ou des rayures vertes. Les fruits peuvent également mûrir irrégulièrement.

Le site de l'OEPP, EPPO Global Database, propose une photothèque relative à la symptomatologie du ToBRFV (<https://gd.eppo.int/taxon/TOBRFV/photos>).

Le ToBRFV appartient au genre tobamovirus et de ce fait ses particules virales sont très stables et restent infectieuses pendant de longues périodes lorsqu'elles sont présentes dans les débris de cultures, le sol ou les surfaces.

\*Le terme poivron englobe dans cette méthode toutes les espèces du genre *Capsicum*.



## Avertissements et précautions de sécurité

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

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

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

Lors de la rédaction de cette méthode, la détention et/ou la manipulation de ce virus est soumise à l'obtention d'un arrêté préfectoral d'agrément en accord avec le règlement de santé végétale 2019/829. Il est nécessaire que les installations de laboratoire permettent le contrôle des déchets solides, liquides afin de pouvoir manipuler les échantillons végétaux dans le cadre de la détection du ToBRFV.

Par ailleurs, l'utilisateur de la présente méthode doit mettre en œuvre toutes les mesures nécessaires pour garantir la non-dissémination de l'organisme nuisible dans l'environnement.

Tout fragment de matériel végétal (quel que soit son statut) doit être détruit par autoclavage ou autre moyen inactivant les virus, ainsi que tous les consommables avec lesquels ils ont été en contact.

Tout matériel utilisé lors du processus doit être désinfecté.



## 1. Objet et domaine d'application

L'objet de cette méthode est de détecter par RT-PCR en temps réel le ToBRFV dans les feuilles, les fruits et les semences de plantes hôtes.

Cette méthode est qualitative, elle permet de détecter la présence du ToBRFV dans la limite du seuil de détection mais ne permet pas de quantifier la cible dans l'échantillon analysé.

L'utilisation d'un couple d'amorces et d'une sonde marquée, dont la combinaison est spécifique du ToBRFV, permet de détecter et d'amplifier un fragment de l'extrémité du gène codant pour la protéine de capsid et de la zone 3' non codante (CP et 3'NCR) (Menzel et Winter, 2020).

La méthode inclut un contrôle interne plante permettant la détection du gène mitochondrial codant pour la cytochrome oxydase (CyOXID) (Papayiannis et al, 2011).

## 2. Documents de référence

MOA 022 : Techniques qualitatives d'amplification enzymatique des acides nucléiques : PCR (Polymerase Chain Reaction), RT-PCR (Reverse Transcription-PCR) et PCR temps réel. Détection et identification des organismes phytopathogènes.

## 3. Termes, sigles et définitions

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

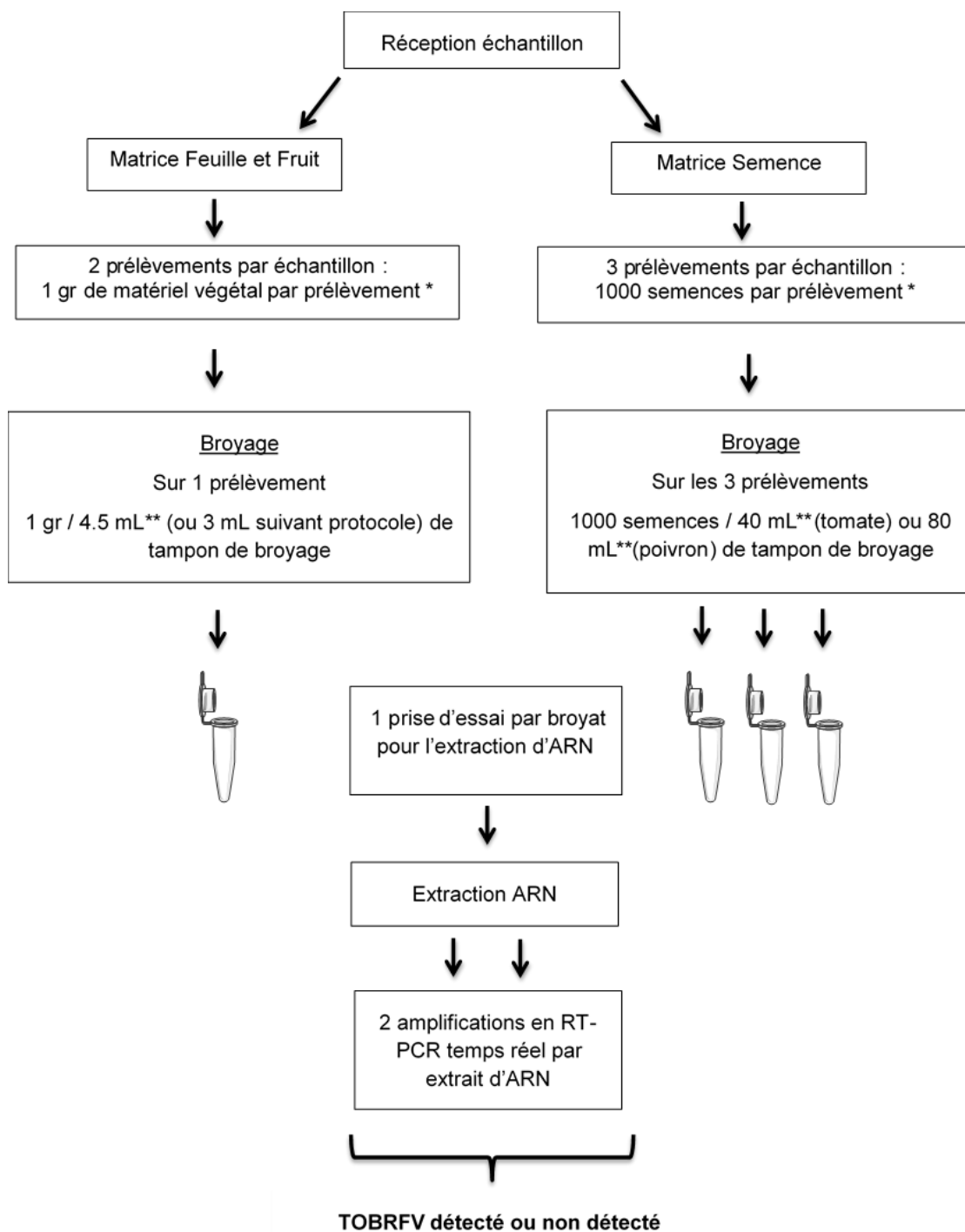
Le glossaire GLO-001 reprend les principales définitions. L'attention des lecteurs est attirée sur le fait que les termes intégrés au glossaire ne sont, en règle générale, pas spécifiquement repérés dans le corps des méthodes officielles.





## 4. Principe de la méthode

Le principe de la méthode est présenté dans le schéma ci-dessous :



\* les prélèvements indiqués sont des recommandations

\*\* en cas de quantité inférieure, respecter le rapport volume/quantité



## 5. Réactifs

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

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

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

### 5.1 Eau

L'eau ultra pure (EUP) doit présenter une qualité suffisante pour une utilisation en biologie moléculaire.

### 5.2 Kits d'extraction d'ARN

L'ARN total des prises d'essai analysées est extrait et purifié à l'aide de kits d'extraction d'ARN de plante disponible dans le commerce.

Les kits d'extraction validés par le LNR pour cette méthode sont le kit RNeasy® Plant Mini Kit Qiagen© et le kit Maxwell® HT simplyRNA Promega© (rapports de caractérisation et de validation « méthode interne » en date du mois d'octobre 2020).

### 5.3 Oligonucléotides

Les séquences (5'-3') des amorces et de la sonde spécifique de l'ARN viral ToBRFV (*Menzel et Winter, 2020*) sont les suivantes :

- ToBRFV-qs1 : 5'- CAA TCA GAG CAC ATT TGA AAG TGC A-3'
- ToBRFV -qs2 : 5' - CAG ACA CAA TCT GTT ATT TAA GCA TC-3'
- ToBRFV-p1 : 5'- [6-FAM] - ACA ATG GTC CTC TGC ACC TG - [BHQ1] - 3'

Les séquences (5'-3') des amorces et de la sonde du contrôle interne de l'ARN ribosomal (*Papayiannis et al, 2011*) sont les suivantes :

- CyOXID-F : 5'- TGG TAA TTG GTC TGT TCC GAT T- 3'
- CyOXID-R : 5'- TGG AGG CAA CAA CCA GAA TG-3'
- CyOXID-Taq : 5'-[Cy5] -ATA GGT GCG CCT GAC ATG GCA TTT CCA CA-[BHQ2] -3'

Les amorces doivent être au minimum de qualité RP cartridge et la sonde de qualité HPLC (exemples des critères de qualité du fournisseur Eurogentec). Dans le cas où d'autres fournisseurs



proposent des critères de qualité différents, le laboratoire doit s'assurer de l'équivalence du niveau de performance.

Le fluorophore rapporteur utilisé pour la sonde peut être modifié, sous réserve que le fluorophore extincteur associé soit adapté, et sous réserve de compatibilité avec l'appareil de PCR en temps réel employé.

#### 5.4 Kit d'amplification de RT-PCR en temps réel

Le kit validé par le Laboratoire National de Référence (LNR) pour cette méthode est le Kit AgPath-ID™ One-Step RT-PCR Kit de chez Applied Biosystems (référence catalogue ThermoFisher Scientific mai 2020 n°4387424).

Le kit d'amplification de RT-PCR utilisé peut-être modifié, sous réserve de performance équivalente.

#### 5.5 Autres consommables à usage unique

- Coupelles de pesée ou autre système de pesée adapté ;
- Sacs de broyage avec gaze de filtration à mailles en nylon à usage unique (type Bioreba) ;
- Cônes à filtre pour pipettes de volumes adaptés (plage 0,5 µL à 5 mL) ;
- Microtubes RNase DNase free de 1,5 mL ou 2 mL ;
- Microtubes ou plaques PCR (qualité biologie moléculaire Rnase free) de volume adapté au thermocycleur temps réel utilisé, à paroi fine, en barrette de 4 ou 8 puits ou en plaque de 96 puits ;
- Plaque Deep-well et Tip combs (qualité biologie moléculaire Rnase free) de volume adapté à l'automate d'extraction utilisé, en plaque de 24 ou 96 puits.

#### 5.6 Contrôles et témoins

La technique de détection de régions cibles d'ARN d'un organisme par la technique de RT-PCR en temps réel requiert l'utilisation d'une série de contrôles et témoins permettant de valider la bonne qualité de la manipulation. Ces contrôles et témoins ont différentes fonctions et leur utilisation permet de garantir que :

- L'opérateur a correctement suivi le protocole,
- Les consommables et réactifs utilisés étaient de qualité suffisante,
- Les volumes prélevés à l'aide des micropipettes, les températures et durées de réaction, la concentration et le pH des solutions utilisées étaient corrects,
- L'extrait d'ARN était suffisant en quantité et amplifiable (pas d'interférence avec des composés inhibiteurs),
- Il n'y a pas eu de contamination accidentelle des échantillons testés.

Les contrôles et témoins à produire permettant de garantir la fiabilité des résultats au cours de l'analyse sont *a minima* les suivants :

- Un contrôle positif d'extraction: il sera préparé pour chaque série d'extractions. Il est composé d'un échantillon défini comme contenant l'organisme cible et positif au ToBRFV. Il subira toutes les phases de l'analyse à partir de la phase d'extraction. Il permet de contrôler la qualité et le bon fonctionnement de l'extraction de l'ARN.

**Attention :** Pour éviter de manipuler des contrôles d'extraction trop fortement contaminés il est préférable de préparer des lots de contrôle positif (feuille, fruit, semence) avec des signaux d'amplification attendus entre  $20 < Ct < 25$



- Un contrôle négatif d'extraction: il sera préparé pour chaque série d'extractions. Il est composé d'un échantillon ne contenant pas l'organisme cible et négatif au ToBRFV. Si possible, il sera de la même espèce végétale que les échantillons testés. Ce contrôle subira toutes les phases de l'analyse à partir de la phase d'extraction. Il permet de vérifier l'absence de contamination croisée par la cible ToBRFV entre les échantillons ou de contamination externe lors de la phase d'extraction de l'ARN.
- Un contrôle négatif de processus : il sera préparé pour chaque série d'extractions. Il est composé d'un échantillon ne contenant, ni l'organisme cible ToBRFV, ni le contrôle interne plante (CyOXID). Il sera composé du tampon de broyage seul. Ce contrôle subira toutes les phases de l'analyse à partir de la phase d'extraction. Il permet de vérifier pour le contrôle interne Cox l'absence de contamination croisée entre les échantillons ou de contamination externe lors de la phase d'extraction de l'ARN.
- Un contrôle positif de RT-PCR (ou témoin positif d'amplification) : il sera systématiquement introduit lors de chaque réaction de RT-PCR en temps réel. Il est composé d'un extrait d'ARN positif au ToBRFV afin de vérifier la qualité de l'amplification ainsi que la qualité de la manipulation et le bon fonctionnement du matériel.

Attention : Pour éviter de manipuler des contrôles positifs trop fortement contaminés il est préférable de préparer des ARN contrôle positif avec des signaux d'amplification attendus entre  $20 < Ct < 25$ .

- Un contrôle négatif de RT-PCR (ou témoin négatif d'amplification) : il sera systématiquement introduit lors de chaque réaction de RT-PCR en temps réel. Il est composé d'une prise du mélange réactionnel préparé pour l'amplification ou d'eau ultra-pure ayant servie à la composition du mélange réactionnel. Il permet de vérifier la qualité de la manipulation et l'absence de contamination lors de cette étape.

Ces témoins sont traités à l'identique des autres échantillons, excepté que la duplication des dépôts d'ARN pour amplification n'est pas requise pour les contrôles.

Ces contrôles ainsi que des contrôles supplémentaires que le laboratoire peut ajouter si nécessaire sont définis par la MOA022.

En cas d'anomalies constatées sur un contrôle, les dispositions de la MOA022 doivent être respectées.

## 6. Appareillage et matériels

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

L'agencement et l'équipement des zones de travail sont définis dans la MOA 022 version en vigueur.

Les matériels utilisés dans la méthode doivent satisfaire aux exigences de la MOA 022 version en vigueur.



Afin d'alléger la lecture de la méthode, seules les valeurs cibles des grandeurs mesurées sont indiquées dans le corps du texte, en unités du système international ou unités dérivées. Les erreurs maximales tolérées (EMT) à prendre en considération sont données dans le Tableau 1 (dans le cas contraire, des spécifications sont précisées dans le texte de la méthode).

Grandeur	EMT
Volume et Masse	EMT définies par la MOA 022 version en vigueur
Température	Thermobloc, bain à sec : EMT = $\pm 5^{\circ}\text{C}$ Réfrigérateur : $5^{\circ}\text{C}$ et EMT = $\pm 4^{\circ}\text{C}$ (ou plus strict en fonction des recommandations fournisseur) Congélateur : $\leq -18^{\circ}\text{C}$ en fonction de l'usage

Tableau 1 : Erreurs maximales tolérées

En plus de l'appareillage courant, le matériel suivant est nécessaire pour certaines phases de l'analyse :

#### Préparation des échantillons

- Balance de portée et d'exactitude adaptées à la pesée des échantillons (ex : balance de classe II) ;
- Pipette automatique (plage de mesure de 1 à 5 mL) et/ou dispenseur ;
  - Broyeur bille type Homex 6 Bioreba (ou autre système de broyage pourvu qu'il permette d'obtenir une qualité de broyage équivalente Cf §8.2 et limite les risques de contaminations) ;
- Petits équipements de laboratoire : ciseaux, pinces, coupelles pesées.

#### Extraction des ARN

- Agitateur de tubes de type Vortex ;
- Centrifugeuse permettant d'atteindre une force centrifuge relative d'environ 250 g à 18 000 g minimum et rotor adapté pouvant recevoir des tubes plastiques de 1,5 et 2 mL ;
- Centrifugeuse de paillasse type « microspin » ;
- Pipettes automatiques (plage de mesure de 0,5  $\mu\text{L}$  à 5 mL) ;
- Epruvette graduée de 50 mL ;
- Thermobloc ou bain-à-sec (température =  $56^{\circ}\text{C}$ ) (pour la lyse cellulaire) ou enceinte thermostatique (température  $56^{\circ}\text{C}$ ).

#### Amplification des ARN

- Pipettes automatiques (plage de mesure de 0,5  $\mu\text{L}$  à 1 mL) ;
- Appareil de PCR en temps réel et ordinateur de pilotage capables de mesurer la fluorescence des fluorophores employés (méthode validée avec l'appareil QS5 Applied biosystem).

Le laboratoire veillera à mettre en place un système de suivi de qualification du thermocycleur utilisé.

#### Stockage des échantillons et des ARN

- Congélateur (température  $\leq -18^{\circ}\text{C}$ ) ;



- Réfrigérateur (température = 5°C).

## 7. Échantillons

### 7.1 Conditions d'acceptation des échantillons

Pour que les échantillons soient acceptés sans réserve, les éléments suivants doivent être respectés :

- Les échantillons de feuilles ou fruits reçus pour analyse doivent être dans un bon état de conservation, c'est-à-dire, ni desséchés, ni nécrosés ni en cours de décomposition. Le temps entre le prélèvement et l'arrivée au laboratoire doit être le plus réduit possible. Si les échantillons ne sont pas envoyés le jour même, ils doivent être conservés au froid avant l'envoi.
- Les échantillons de semences reçus pour analyses doivent préférentiellement être non traités. Cette méthode convient également pour les semences traitées par des procédés physiques ou chimiques (extraction acide, hypochlorite de calcium ou de sodium, phosphate trisodique, etc.) dans le but de désinfestation / désinfection. Dans le cas de semences pelliculées, le contrôle interne Cox permet de vérifier l'absence d'antagonisme et / ou d'inhibition de l'analyse. Dans ce dernier cas, une observation sera indiquée sur le rapport d'analyse précisant que les semences analysées étaient pelliculées. Cette méthode ne convient pas pour les semences enrobées.
- Chaque échantillon est conditionné individuellement dans un emballage hermétique et parfaitement identifié (référence figurant sur la fiche de demande d'analyse). Toutes les mesures doivent être prises pour conserver l'intégrité de l'échantillon et éviter les contaminations par d'autres échantillons. Pour les échantillons lyophilisés ou déshydratés, ils doivent être complètement déshydratés, c'est-à-dire sans développement de moisissures.
- La taille de l'échantillon est suffisante pour réaliser les prises d'essai nécessaires.
- Présence d'une fiche de demande d'analyse par échantillon : formulation claire de la demande, identification du végétal, de l'expéditeur, référence des échantillons. Cette fiche est fixée à l'extérieur du colis.

**Dans le cas contraire, le laboratoire contacte le client dans les plus brefs délais et se réserve le droit de refuser la demande d'analyse en explicitant les raisons de ce refus.**

### 7.2 Conservation des échantillons avant analyse

Le délai entre la réception de l'échantillon et le début effectif de l'analyse doit être le plus court possible.

Pour les échantillons de feuilles et fruits prélevés dans de bonnes conditions, le délai entre la réception des échantillons et le début effectif de l'analyse doit être de préférence inférieur à 3 jours sans dépasser 5 jours. En attente de l'analyse, les échantillons sont conservés à +5°C.

Si les échantillons de feuilles ou de fruits ne peuvent être traités dans ce laps de temps, ils seront congelés à une température inférieure ou égale à -18°C, en attente de traitement (maximum 1 mois). Dans ce cas, la prise d'essai doit être effectuée, si possible, avant la congélation.



Les échantillons de semences peuvent être conservés dans un endroit frais et sec ou conservés à +5°C au réfrigérateur jusqu'à l'analyse.

### 7.3 Conservation des échantillons ou reliquats après analyse

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.

Cas d'un échantillon négatif : au minimum jusqu'au quinzième jour ouvrable suivant l'envoi au demandeur d'un rapport d'analyse pour éventuellement permettre la demande d'une analyse contradictoire par le client.

Cas d'un échantillon positif : pour 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.

Les conditions de conservation des différents types de reliquats d'échantillon à conserver en vue d'éventuelles analyses complémentaires sont présentées dans le Tableau 2.

Etapas	Type de reliquat	Conservation		Modalités d'envoi à un autre laboratoire le cas échéant
		Durée	Conditions	
Prélèvement	Feuilles, Fruits, Semences	Résultat négatif : 15 jours après envoi du rapport	+5°C	Sachets individuels fermés et clairement identifiés Température ambiante Transporteur rapide
		Résultat autre que négatif: 12 mois	+5°C jusqu'à obtention du résultat (ou jusqu'à envoi au LNR) puis ≤-18°C*	
Broyage	Broyat végétal	Résultat négatif : 15 jours après envoi du rapport	≤-18°C	Sachets / Tubes / pots fermés hermétiquement et clairement identifiés Bloc froid Transporteur rapide
		Résultat autre que négatif: 12 mois		
Extraction d'ARN	Extraits d'ARN	Résultat négatif : 15 jours après envoi du rapport	≤-18°C	Tubes hermétiques clairement identifiés Bloc froid Transporteur rapide
		Résultat autre que négatif: 12 mois		

\*sauf semences

Tableau 2: Conditions de conservation des échantillons feuilles, fruits et semences.

## 8. Mode opératoire

Le laboratoire doit mettre en place une procédure adaptée à son environnement (locaux, infrastructures, ...) visant à éviter tout risque de confusion entre échantillons et tout risque de contamination d'un échantillon par un autre.

### 8.1 Préparation des échantillons pour analyse

Les échantillons sont à manipuler avec des gants (désinfecter les gants avec une solution d'hypochlorite de sodium ou produit équivalent, ou les remplacer, entre chaque échantillon).



Entre chaque échantillon, les coupelles de pesée sont changées, et la paillasse est nettoyée avec de l'hypochlorite de sodium (2,6 % de chlore actif) ou un produit d'efficacité équivalente (Virkon 1%...) afin d'éviter les contaminations croisées (destruction des traces d'ARN).

Chaque prélèvement est déposé dans un sachet de broyage avec gaze pour la filtration des particules grossières (type Bioreba). Chaque sachet sera préalablement identifié pour assurer la traçabilité.

### 8.1.1 Préparation des échantillons de feuilles ou de fruits

Pour chaque échantillon de feuille ou de fruit, 2 prises d'essai de 1g sont réalisées : 1 prise d'essai sera utilisée pour l'analyse et 1 prise d'essai sera conservée selon les conditions décrites dans le paragraphe 7.2.

Pour les prises d'essai des échantillons de feuilles ou fruits, les intervalles de pesée de 5% doivent être appliqués.

**Remarque** : Si le matériel est déshydraté ou lyophilisé, la pesée correspondante à un gramme de matériel frais est de 0,04 g.

### 8.1.2 Préparation des échantillons de semences

Pour les lots de semences de tomate ou de poivrons, il est recommandé de travailler avec des échantillons de 3000 semences subdivisées en sous lots de 1000 maximum. Ce protocole a été validé sur des échantillons de 3000 semences subdivisées en trois prises d'essai de 1000 semences. Cette méthode a été validée pour la détection de 1 graine dans 1000.

Si le lot de semences est inférieur à 3000, les prises d'essais sont réalisées à concurrence de 1000 semences par sachet puis les volumes sont adaptés au prorata des quantités restantes (Exemple: pour 2500 semences, réaliser 3 prises d'essai ; deux de 1000 graines et une de 500 graines).

Si la prise d'essai est inférieure à 1000 semences, ajouter un volume de tampon au prorata du nombre de semences avec un minimum de 600µL (Kit RNeasy® plant mini Kit QIAGEN®) ou 1mL (kit Maxwell® HT simplyRNA PROMEGA®) (Tableau 3).

En fonction de la taille des échantillons de semences (cf Annexe 1 règlement UE 2020/1191), la taille de la prise d'essai devra être adaptée avec un minimum correspondant au Tableau 3.

Nature du Kit	Tomate		Poivron	
	Volume de broyage minimum	Nombre de semences minimum	Volume de broyage minimum	Nombre de semences minimum
Kit RNeasy® plant mini Kit QIAGEN®	600µL	15	600µL	8
kit Maxwell® HT simplyRNA PROMEGA®	1 mL	25	1mL	13

Tableau 3 : Prélèvement minimum (nombre de semences) et volume de broyage suivant le kit d'extraction utilisé.

Le prélèvement de semences peut être réalisé par comptage ou par pesée (ou autre méthode équivalente).





Exemple de pesée : préparer 3 séries de 100 graines, en les pesant, et en multipliant le poids moyen obtenu par 10. Une quantité de graines correspondant à ce poids de 1000 semences sera prélevée et pesée avec une erreur maximale tolérée de 5%.

## 8.2 Broyage des échantillons

### 8.2.1 Broyage de feuilles ou de fruits

Ajouter à la prise d'essai le volume de tampon adapté au kit d'extraction utilisé:

- Kit RNeasy® plant mini Kit QIAGEN® : 4,5 mL de tampon RLT ;
- Kit Maxwell® HT simplyRNA PROMEGA® : 3 mL de tampon de Lyse Froid (préparation annexe 3). Il est possible aussi ici d'utiliser 3 mL de tampon PBS au lieu du tampon de Lyse froid et procéder à l'extraction comme pour les semences (cf § 8.3 Tableau 4 et annexe 2).

Broyer finement la prise d'essai à l'aide d'un broyeur à billes ou de toute autre méthode de broyage permettant d'obtenir des résultats comparables.

Les broyats obtenus doivent être conservés au réfrigérateur et utilisés dans les **4h maximum**. Après utilisation, les broyats doivent être conservés au congélateur pour des besoins ultérieurs.



Photo 1 : Broyage d'un prélèvement de feuille de tomate

### 8.2.2 Broyage de semences

Broyer chaque prise d'essai de 1000 semences de tomate dans 40 mL de tampon PBS ou 80 mL pour les semences de poivrons (Annexe 5). Si la prise d'essai est inférieure à 1000 semences, ajouter un volume de tampon au prorata du nombre de semences avec un minimum de 600µL (Kit RNeasy® plant mini Kit QIAGEN®) ou 1mL (kit Maxwell® HT simplyRNA PROMEGA®).

Utiliser un sachet de broyage adapté (type Bioreba) et broyer à l'aide d'un broyeur à billes ou de toute autre méthode de broyage permettant d'obtenir des résultats équivalents.

Les broyats obtenus doivent être soit conservés au réfrigérateur et utilisés dans les **4h maximum**, soit conservés au congélateur. Après utilisation, les broyats doivent être conservés au congélateur



pour des besoins ultérieurs. Pour raison pratique, il est préférable qu'une partie de ces broyats soit aliquotée en tube Eppendorf de 2 mL.



Photo 2 : Broyage d'un prélèvement de semence de tomate

### 8.3 Extraction de l'ARN total

L'ARN est extrait selon l'un des modes opératoires suivant :

- Extraction d'ARN Kit RNeasy® plant mini Kit QIAGEN®
- Extraction d'ARN kit Maxwell® HT simplyRNA PROMEGA®

Les protocoles sont disponibles en annexe.

Pour chaque échantillon de feuille ou de fruit, 1 seule prise d'essai est extraite.

Pour les semences, les 3 prises d'essai sont extraites individuellement. Dans le cas où les 3 prises d'essai ne sont pas possibles, la règle suivante s'applique :

- Si 1 seule prise d'essai par échantillon est disponible (échantillon  $\leq 1000$  semences), 2 extraits ARN sont préparés à partir de la même prise d'essai.
- Si 2 prises d'essai et plus par échantillon sont disponibles, 1 seul extrait ARN est préparé par prise d'essai.

Le volume de broyat est dépendant du kit utilisé et est présenté dans le Tableau 4.

Kit	Vol ( $\mu$ L) Broyat feuille / fruit	Vol ( $\mu$ L) Broyat semence
RNeasy® plant mini Kit	<b>450 <math>\mu</math>L</b> (lyse directe, $\emptyset$ ajout)	<b>100 <math>\mu</math>L</b> (+ ajout 450 $\mu$ L RLT)
Maxwell® HT simplyRNA	<b>300 <math>\mu</math>L</b> (lyse directe, $\emptyset$ ajout)	<b>200 <math>\mu</math>L</b> (+ ajout 200 $\mu$ L Lyse froid)

Tableau 4 : Volume de broyat pour l'extraction d'ARN

Pour chaque série d'extraction, insérer les témoins tel que décrit au point 5.6.



## 8.4 Test de détection par RT-PCR en temps réel

Pour chaque extrait d'ARN, deux amplifications doivent être réalisées.

**Ne pas vortexer les extraits d'ARN car ils sont fragiles et éviter les cycles successifs de congélation/décongélation.**

Pour chaque série d'amplification, insérer les témoins RT-PCR d'amplification tel que décrit au point 5.6.

Les protocoles proposés correspondent à ceux validés par le LNR avec le kit Kit AgPath-ID™ One-Step RT-PCR Kit de chez Applied Biosystems (référence catalogue ThermoFisher Scientific mai 2020 n°4387424).

La composition du mélange réactionnel pour une réaction est présentée dans le Tableau 5.

Réactifs	Quantité finale / concentration finale
Eau ultra pure	qsp 18 µL
RT-PCR Buffer AgPath-ID™ One-Step Kit	1X
RT-PCR Enzyme AgPath-ID™ One-Step Kit	1U
Amorce ToBRFV-qs1	0,30 µM
Amorce ToBRFV-qs2	0,30 µM
Sonde ToBRFV -p1	0,25 µM
Amorce CyOXID-F	0,20 µM
Amorce CyOXID-R	0,20 µM
Sonde CyOXID-TAQ	0,10 µM
Volume réactionnel	18 µL
Extrait d'ARN	2 µL
Volume final	20 µL

Tableau 5 : Composition du mélange réactionnel

Les différents paramètres de l'amplification par RT-PCR en temps réel pour la détection du ToBRFV sont présentés dans le Tableau 6.

Etape	Température	Durée programmée	Nbre de cycle
Transcription de l'ARN en ADNc	48°C	15 min	1
Dénaturation	95°C	10 min	
Dénaturation	95°C	15 s	40
Hybridation / Elongation (mesure de la fluorescence à la fin de chaque cycle)	60°C	1min	

Tableau 6 : Paramètres d'amplification



## 9 Résultats

### 9.1 Cut-off

Lors de l'évaluation des critères de performance de la méthode menée par le LNR, il est apparu que des signaux tardifs pouvaient apparaître et être interprétés comme faux positifs. Il a donc été intégré un « cut-off » ou « Cycle threshold limite » au-delà duquel la garantie de déclarer un échantillon positif n'était plus assurée de façon répétable.

Les tests réalisés au LNR sur plusieurs types de matrices végétales ont permis d'établir qu'à partir de 35 cycles, la méthode n'était plus suffisamment répétable. Le « cut off » de cette méthode est donc fixé à 35 cycles.

### 9.2 Contrôle de la validité des résultats

Pour la détermination de la ligne de seuil (threshold), il est recommandé d'utiliser la détermination automatique réalisée avec le logiciel du thermocycleur. La validation de l'analyse s'effectue en observant les courbes de fluorescence mesurées par l'appareil de PCR en temps réel et générées à partir des différents témoins.

Une valeur de Ct doit être accompagnée d'une courbe de type exponentiel (en échelle linéaire et exponentielle) pour être prise en compte (ex : courbure parallèle aux témoins positifs).

Remarque : Si la courbe présente une amplification atypique de type saturation du signal (en cloche), l'analyse doit être renouvelée pour l'échantillon concerné en utilisant un extrait dilué au 1/100<sup>ème</sup>.

L'analyse est considérée validée si et seulement si l'ensemble des conditions suivantes est réuni en fin de réaction :

- Le contrôle négatif d'extraction et le témoin négatif d'amplification n'ont pas généré de courbe de fluorescence FAM caractéristique, ni de valeur de Ct, ou bien une valeur de Ct  $\geq$  à 35. Ces contrôles permettent de vérifier l'absence de contamination croisée accidentelle par la cible ToBRFV.
- Le contrôle négatif de processus n'a pas généré de courbe de fluorescence Cy5 caractéristique, ni de valeur de Ct, ou bien une valeur de Ct  $\geq$  à 33(Cox). Ce contrôle permet de vérifier l'absence de contamination croisée accidentelle par la cible Cox.
- Le contrôle positif d'extraction et le témoin positif d'amplification ont généré une courbe de fluorescence FAM de type exponentielle et une valeur de Ct  $<$  à 35. Le contrôle positif d'extraction permet de vérifier le bon déroulement de l'extraction. Le témoin positif d'amplification permet de vérifier la qualité des réactifs PCR et les paramètres d'amplification.
- Le contrôle interne Cytochrome oxydase (témoin d'inhibition de PCR) a généré une courbe de fluorescence Cy5 de type exponentielle et une valeur de Ct  $\leq$  à 27. Ce contrôle permet de vérifier l'absence d'inhibition de la réaction PCR et de justifier de la qualité des ARN extraits.

Dans le cas où une ou plusieurs conditions ne seraient pas respectées, l'analyse n'est pas validée et selon le type d'anomalie observée, tout ou partie de l'analyse est à refaire (MOA 022).



### 9.3 Calculs et expression des résultats

Si la série d'analyse est validée par le contrôle des témoins, les résultats peuvent être considérés comme interprétables.

#### 9.3.1 Interprétation résultats du contrôle interne

Pour valider l'interprétation d'un résultat d'échantillon négatif, le contrôle interne plante CyOXID d'un extrait pur doit présenter un  $Ct \leq 27$  pour le fluorophore Cy5.

#### 9.3.2 Interprétation des résultats ToBRFV

Les règles d'interprétation des résultats de la cible ToBRFV (fluorophore FAM) sont présentées dans le Tableau 7.

Résultat	Matrice		Interprétation
	Feuilles / Fruits	Semences	
Absence de courbe caractéristique ou :	No Ct	No Ct	Négatif
Présence de courbe caractéristique et :	$Ct \geq 35$	$Ct \geq 35$	Négatif
	$Ct < 30$	$Ct < 35$	Positif
	$30 \leq Ct < 35$		(*)

Tableau 7 : Règles d'interprétation des résultats de RT-PCR pour la cible ToBRFV.

(\*) Pour les échantillons de feuilles ou fruits présentant un Ct tardif ( $30 < Ct < 35$ ) : une deuxième analyse est réalisée à partir d'une nouvelle extraction sur la deuxième prise d'essai. Si après analyse, l'interprétation du résultat indique un  $Ct < 35$ , l'échantillon est déclaré « positif ».

Pour les échantillons de feuilles ou fruits : Pour les échantillons de feuilles ou fruits, le statut d'un échantillon est déterminé sur la base des critères suivants :

- Pour qu'un échantillon soit déclaré positif, il suffit qu'au moins une des deux PCR soit positives.
- Pour qu'un échantillon soit déclaré négatif, il faut que les deux PCR soient négatives.

Remarque : l'extraction et/ou l'amplification d'ARN pourra être renouvelée sur décision du laboratoire.



Pour les échantillons de semences : Le statut de l'échantillon est déterminé selon la règle de décision décrite dans le Tableau 8 pour 1, 2 ou 3 extraits ou prises d'essais.

	Extrait 1 ou prise d'essai 1	Extrait 2 ou prise d'essai 2	Extrait 3 ou prise d'essai 3	Statut de l'échantillon
Résultats des cibles	Négatif	Négatif	Négatif	Négatif
	Positif	Positif	Positif	Positif
	Positif	Positif	Négatif	Positif
	Positif	Négatif	Négatif	Positif
	Positif	Négatif		Positif**

Tableau 8 : Règle de décision du statut de l'échantillon (valable pour semences).

(\*\*) *Si les deux extraits proviennent d'une même prise d'essai (cf. §8.3), refaire l'analyse à partir de deux nouveaux extraits. Si le deuxième résultat d'analyse est « négatif/positif » ou « positif/positif », l'échantillon est déclaré « positif ». Dans l'autre cas, il est déclaré « négatif ».*

Expression des résultats sur le rapport d'analyse :

- Le résultat final du test est exprimé sous forme qualitative : « négatif/positif », « détecté/non détecté » ou mention équivalente.
- La référence de la méthode d'analyse utilisée sera mentionnée, par exemple: « Détection de ToBRFV par RT PCR en temps réel sur plante hôte - méthode ANSES/LSV/MA066 ».
- Dans le cas d'une analyse réalisée sur semences, une réserve est émise en observation sur le rapport d'analyse si la quantité analysée est inférieure aux recommandations (3000 semences). Il sera précisé le nombre de prises d'essai et si une seule prise d'essai a été réalisée, le nombre total de semences analysées.
- Dans le cas d'une analyse réalisée sur semences pelliculés, une observation est indiquée sur le rapport d'analyse précisant que les semences analysées étaient pelliculées.

**Les échantillons déclarés positifs pourront être confirmés lors d'une nouvelle analyse réalisée par le LNR sous réserve d'une demande du client initial.**



## 10 Caractéristiques de performance de la méthode

La synthèse des caractéristiques de performances de la méthode présentée dans le tableau 9 est extraite du rapport de validation réalisé en 2020 et établi par le LNR le 19/11/2020.

Caractéristique de performance	Valeur obtenue à l'issue de la caractérisation
Inclusivité	100%
Exclusivité	100%
Sensibilité analytique*	de $1.10^{-5}$ à $1.10^{-9}$
Exactitude	100%
Répétabilité	100%
Praticabilité	82%

\*suivant la charge virale initiale

Tableau 9 : Synthèse et validation des résultats des caractéristiques techniques.



## Annexe 1 Protocole d'extraction d'ARN Kit RNeasy® plant mini Kit QIAGEN©

Ce protocole est adapté du protocole du fournisseur Qiagen© pour le kit RNeasy® Plant Mini Kit (référence mai 2020 n°74904).

- Allumer et programmer la centrifugeuse à température ambiante et selon les recommandations ci-dessous,
- Mettre en chauffe le thermobloc ou le bain-à-sec à 56°C.
- Référencer tous les microtubes et colonnes nécessaires à la série d'extraction.
- Homogénéiser par massage avec les doigts les sachets contenant le broyat végétal,
- Transférer chaque volume de broyat (cf § 8.3 Tableau 4) dans les microtubes préalablement référencés de 1,5 mL et complétés de 450 µL de tampon RLT si nécessaire (semences).
- Introduire à ce stade les contrôles d'extraction et le contrôle de processus négatif par série d'extraction tel que décrit au § 5.6.
- Incuber ces microtubes 3 minutes à 56°C dans le bain à sec.
- Transférer le contenu de chaque microtube dans une colonne QIAshredder (violet) précédemment référencée et posée sur microtube de 2mL.
- Centrifuger 2 minutes à environ 18.000g.
- Transférer l'éluât sans le culot dans un microtube de 2mL contenant 200µL d'éthanol à 96-100 % (ou 0,5 vol).
- Homogénéiser immédiatement par pipetage.
- Transférer le tout (min 600 µL) sur une colonne Rneasy (rose) placée sur un microtube sans bouchon de 2mL.
- Centrifuger 1 minute à une vitesse  $\geq$  à 8000 g.
- Jeter l'éluât, ajouter 700 µL de tampon « RW1 » dans chaque colonne et centrifuger 1 minute à une vitesse  $\geq$  à 8000 g.
- Jeter l'éluât, ajouter 500 µL de tampon « RPE » dans chaque colonne et centrifuger 1 minute à une vitesse  $\geq$  à 8000 g.
- Jeter l'éluât, ajouter 500 µL de tampon « RPE » dans chaque colonne et centrifuger 2 minutes à une vitesse  $\geq$  à 8000 g.
- Jeter l'éluât et le tube sans bouchon puis placer chaque colonne Rneasy (rose) sur une nouvelle série codée de microtubes de 1,5 mL
- Ajouter 50 µL d'eau RNase free au centre de chaque colonne et attendre environ 5 minutes.
- Centrifuger 1 minute à une vitesse  $\geq$  à 8000 g pour éluer l'ARN.
- Jeter la colonne Rneasy (rose).

Les extraits d'ARN peuvent être utilisés directement pour réaliser la RT-PCR ou ils peuvent être stockés à  $\leq -18^{\circ}\text{C}$  pour une conservation de quelques mois.

Remarque : au cours des étapes de lavages avec les tampons RW1 et RPE, il est possible de changer les séries de microtubes de 2 mL sans bouchon afin de limiter toutes contaminations éventuelles.





## Annexe 2 – Protocole d'extraction d'ARN kit Maxwell® HT simplyRNA PROMEGA©

Ce protocole est adapté du protocole du fournisseur Promega© pour le kit Maxwell® HT simplyRNA (référence avril 2020 n°AX2420).

- Référencer tous les microtubes nécessaires à la série d'extraction.
- **Pour le broyat des feuilles / fruits directement dans le tampon de Lyse Froid**
  - Dans une série de microtubes de 1,5 mL numérotés, distribuer 320µl du mélange Cell lysis buffer/ protéinase K, (préparation par échantillon : 300µL de Cell lysis buffer et 25µL de protéinase K).
  - Homogénéiser par massage avec les doigts les sachets contenant le broyat végétal.
  - Transférer 300µL du broyat végétal dans les microtubes préalablement référencés de 1,5 mL.
  - Introduire à ce stade les contrôles d'extraction et le contrôle de processus négatif par série d'extraction tel que décrit au § 5.6.
  - Vortexer.
  - Incuber les échantillons à température ambiante pendant 10 min.
  - Centrifuger les tubes à vitesse max (environ 18.000-20.000g) pendant 2 minutes.
  - Reprendre le surnageant (environ 600µL) en évitant de pipeter des débris et le déposer dans chaque puits de la plaque « Lysis and Binding Plate » pour chaque échantillon selon le plan de dépôt prévu.
  - Préparer toutes les plaques nécessaires au bon déroulement de l'extraction (Annexe 4).
  - Allumer l'automate d'extraction, installer les plaques et démarrer le programme « Maxwell® HT simplyRNA » pour une durée de 120 min environ.
- **Pour le broyat des semences dans le tampon PBS**
  - Dans une série de microtubes de 1,5 mL numérotés, distribuer 200µl du tampon de Lyse froid (Annexe 3).
  - Homogénéiser par massage avec les doigts les sachets contenant le broyat végétal.
  - Transférer 200µL du broyat végétal dans les microtubes préalablement référencé de 1,5 mL.
  - Introduire à ce stade les contrôles d'extraction et le contrôle de processus négatif par série d'extraction tel que décrit au § 5.6.
  - Homogénéiser par va et vient ou en vortexant.
  - Ajouter dans chaque microtube 220µL du mélange Cell lysis buffer/ protéinase K, (préparation par échantillon : 200µL de Cell lysis buffer et 25µL de protéinase K).
  - Vortexer.
  - Incuber les échantillons à température ambiante pendant 10 min.
  - Centrifuger les tubes à vitesse max (environ 18.000-20.000g) pendant 2 minutes,
  - Reprendre le surnageant (environ 600µL) en évitant de pipeter des débris et le déposer dans chaque puits de la plaque « Lysis and Binding Plate » pour chaque échantillon selon le plan de dépôt prévu.
  - Préparer toutes les plaques nécessaires au bon déroulement de l'extraction (Annexe 4).
  - Allumer l'automate d'extraction, installer les plaques et démarrer le programme « **Maxwell® HT simplyRNA** » pour une durée de 120 min environ.



### Annexe 3 –Tampon Lyse Froid kit Maxwell® HT simplyRNA PROMEGA®

Pour 2 plaques de 96 échantillons broyés dans du Lyse Froid : mélanger 600mL de **solution d'homogeneization** + 12 mL de **thioglycérol** (stocké au réfrigérateur). Maintenir cette solution au **froid** (2-10°C ou sur glace). DLU : **1 mois à 4°C** dans la chambre froide.

Pour 1 plaque de 96 échantillons broyés dans du PBS : 30 mL de **solution d'homogeneization** + 600 µL de **thioglycérol**

### Annexe 4 –Préparation plaques kit Maxwell® HT simplyRNA PROMEGA®

Plaque	Tampons	Volumes par puits	Volumes par plaque	Distribution par puits
Lysis and Bind	Binding Buffer III, AX164X	350 µL	35 mL	370 µL
	Magnetic Beads, AX172X	25 µL	2,5 mL	
	Lysat	600 µL		
Wash 1	Wash, X970X, Custom	900 µL		
Wash 2/ DNase	RNA DNase Wash, X968X, Custom	190 µL	19 mL	200 µL
	Resuspended DNase I (stocké au congélateur)	10 µL	1 mL	
Bind 2	Binding solution 2, X969X	200 µL		
Wash 3	Wash, X970X ,Custom	200 µL		
Wash 4	Ethanol 80%	200 µL		
Elution	Nuclease free water, P1165	100 µL		

### Annexe 5 –Préparation du tampon PBS (Phosphate Buffered Saline) pH7,2 - 7,4

Composant	Masse ou volume
Chlorure de sodium (NaCl)	8,0 g
Hydrogénophosphate disodique (Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> )	1.15 g
dihydrogénophosphate de Potassium (KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> )	0,20 g
Eau déminéralisée	Qsp 1 L
<i>Ajuster le pH à 7,2/7.4</i>	
<i>Autoclavage 121°C pendant 20 min</i>	



ou

Composant	Masse ou volume
Chlorure de sodium (NaCl)	8,0 g
Dodeca Hydrogénophosphate disodique ( $\text{Na}_2\text{HPO}_4, 12\text{H}_2\text{O}$ )	2,7 g
dihydrogénophosphate de sodium ( $\text{NaH}_2\text{PO}_4, 2\text{H}_2\text{O}$ )	0,40 g
Eau déminéralisée	Qsp 1 L
<i>Ajuster le pH à 7,2</i>	
<i>Autoclavage 121°C pendant 20 min</i>	



## Bibliographie

- Anonyme, Avis de l'Agence nationale de sécurité sanitaire de l'alimentation, de l'environnement et du travail relatif à « Evaluation du Risque Simplifiée du tomato brown rugose fruit virus », Saisine n° 2019-SA-0080, 25 Avril 2019.
- EPPO (2020) EPPO Global Database (available online). <https://gd.eppo.int> [last accessed 2020-04-15]
- Luria N, Smith E, Reingold V, Bekelman I, Lapidot M, Levin I, Elad N, Tam Y, Sela N, Aburas A, Ezra N, Haberman A, Yitzhak L, Lachman O & Dombrovsky A (2017) A New Israeli Tobamovirus Isolate Infects Tomato Plants Harboring Tm-2 2 Resistance Genes. PLoS ONE, 1–19. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0170429>
- Menzel, W & Winter S (2020) Identification of novel and known tobamoviruses in tomato and other solanaceous crops using a new pair of generic primers and development of a specific RT-qPCR for ToBRFV. Acta horticulturae (in press)
- NAPPO (2018) Official Pest Reports. Tomato Brown Rugose Fruit Virus: detected in the municipality of Yurecuaro, Michoacan. Retrieved from <https://www.pestalerts.org/oprDetail.cfm?oprID=765>
- Panno S, Caruso AG, Blanco G, Davino S, 2020. First report of Tomato brown rugose fruit virus infecting sweet pepper in Italy. New Disease Reports 41, 20. <http://dx.doi.org/10.5197/j.2044-0588.2020.041.020>
- Papayiannis LC, Harkou IS, Markou YM, Demetriou CN, Katis NI, 2011. Rapid discrimination of Tomato chlorosis virus, Tomato infectious chlorosis virus and co-amplification of plant internal control using real-time RT-PCR. journal of Virological Methods 176, 53-9.
- Salem N, Mansour A, Ciuffo M, Falk BW & Turina M (2016) A new tobamovirus infecting tomato crops in Jordan. Archives of Virology, 161(2), 503–506. <https://doi.org/10.1007/s00705-015-2677-7>
- Salem NM, Cao MJ, Odeh S, Turina M & Tahzima R (2019) First report of tobacco mild green mosaic virus and tomato brown rugose fruit virus infecting *Capsicum annuum* in Jordan. APS Publication, 1–3. <https://doi.org/10.1094/PDIS-06-19-1189-PD>