

Méthode d'analyse

En santé des végétaux

Référence : M-GEVES/SV/MO/010

Version : 1.0

Octobre 2025

Détection de pepino mosaic virus (PepMV) sur semences de tomate (*Solanum lycopersicum*)

Groupe d'étude et de contrôle des variétés et des semences (GEVES) – Laboratoires de l'unité technique détection de bioagresseurs

Laboratoire National de Référence : Virus phytopathogènes « Pepino mosaic virus sur semences vraies »

Le présent document est, sous sa forme électronique, mis à la disposition des utilisateurs en tant que méthode d'analyse. Ce document est la propriété du GEVES. Toute reproduction, qu'elle soit totale ou partielle, n'est autorisée qu'à la condition expresse que la source soit citée : GEVES, Méthode d'analyse en santé des végétaux, Détection de pepino mosaic virus (PepMV) sur semences de tomate; M-GEVES/SV/MO/010, 1.0 ; © 2025

Historique de la méthode

Modification majeure : une modification majeure est une modification qui porte sur le domaine d'application de la méthode, sur un point critique de la méthode et qui peut avoir une influence sur la qualité du résultat dans la mesure où elle modifie les critères de performance de la méthode. Avant de valider une modification majeure, une étape de validation partielle ou totale est nécessaire.

Modification mineure : une modification mineure est une modification qui n'influence pas les critères de performance de la méthode. Il s'agit de modification de type correction mineure, précision, reformulation. Une modification mineure ne nécessite pas de validation.

Tableau 1 : Récapitulatif des différentes versions de la méthode.

Version	Date	Type de modification	Principales modifications
M-GEVES/SV/MO/O10 v1.0	Octobre 2025	Majeure	Création de la méthode

Sommaire

1.	Introduction.....	4
1.1.	<i>Validation de la méthode.....</i>	<i>4</i>
2.	Avertissements et précautions de sécurité.....	5
3.	Objet et domaine d'application	6
4.	Termes, sigles et définitions	6
5.	Principe de la méthode.....	7
6.	Témoins, réactifs et matériels.....	8
6.1.	<i>Généralités</i>	<i>8</i>
6.2.	<i>Témoins.....</i>	<i>8</i>
6.3.	<i>Réactifs.....</i>	<i>9</i>
6.3.1.	Macération et broyage	9
6.3.2.	Extraction d'ARN	9
6.3.3.	Détection par RT-PCR.....	9
6.4.	<i>Matériel.....</i>	<i>10</i>
6.4.1.	Macération et broyage	10
6.4.2.	Extraction d'ARN	10
6.4.3.	Détection par RT-PCR.....	10
7.	Échantillons	10
7.1.	<i>Taille, conditionnement</i>	<i>10</i>
7.2.	<i>Conservation.....</i>	<i>10</i>
7.3.	<i>Critères d'acceptation.....</i>	<i>10</i>
8.	Mode opératoire.....	11
8.1.	<i>Prise d'essai.....</i>	<i>11</i>
8.2.	<i>Macération</i>	<i>11</i>
8.3.	<i>Broyage.....</i>	<i>11</i>
8.4.	<i>Extraction</i>	<i>12</i>
8.5.	<i>Détection par RT-PCR.....</i>	<i>12</i>
8.5.1.	Réalisation de la RT-PCR.....	12
8.5.2.	Interprétation des résultats	13
9.	Résultats.....	14
10.	Devenir des reliquats d'échantillon après analyse	14
11.	Annexe.....	15
12.	Bibliographie	16

1. Introduction

Pepino mosaic virus (PepMV, *Potexvirus pepini*) est un virus du genre Potexvirus à ARN simple brin. Il existe cinq souches de PepMV : Européenne (EU), Chilienne (CH2), Nord Amérique (US1/CH1), Péruvienne (LP) et nouvelle Péruvienne (PES) (Hanssen and Thomma 2010, Hanssen *et al.*, 2009, Moreno-Pérez *et al.*, 2014).

Ce virus a comme hôtes principaux la tomate (*Solanum lycopersicum*) et le poire-melon (*Solanum muricatum*) (Van der Vlugt *et al.*, 2000, Jones *et al.*, 1980, EPPO Global database, 2025). Sur la tomate, PepMV provoque une large gamme de symptômes tels que des marbrures, décolorations et perforations des fruits, des déformations et chloroses foliaires, l'apparition de tâches angulaires jaunes, de mosaïques et de nécroses sur feuilles, pouvant aller jusqu'à un flétrissement de la plante et une nécrose du système vasculaire (Hanssen *et al.*, 2010). Ces symptômes engendrent des pertes de rendement considérables sur une culture d'importance économique. Les semences sont une voie avérée de dispersion et de transmission de ce virus (Córdoba-Sellés *et al.*, 2007, Ling 2008).

Pour limiter la propagation de ce virus, PepMV a été classé Organisme Réglementé Non de Quarantaine (ORNQ) par l'Union Européenne (Règlement d'exécution 2019/2072, Règlement 2016/2031).

Cette méthode officielle est inspirée de la méthode ISF-ISHI v6 basée sur le principe de la Seed Extract PCR (SE-PCR). Elle comporte une première étape de macération puis broyage, suivie d'une extraction d'ARN puis d'une reverse transcription et PCR (RT-PCR) en temps réel permettant de détecter spécifiquement PepMV.

1.1. Validation de la méthode

La méthode SE-PCR de l'ISF-ISHI a été validée en évaluant différents critères de performance (Berendsen *et al.*, 2023, Berendsen *et al.*, 2024). Les résultats de la validation sont résumés dans le **Tableau 2**. Les tests ont été réalisés avec le kit d'extraction RNeasy Plant Mini Kit de Qiagen et/ou avec le kit Maxwell HT Simply RNA custom Kit de Promega.

L'inclusivité et l'exclusivité (spécificité analytique) ont été évaluées par l'ISF-ISHI, *in silico* par blast sur la base de données NCBI puis *in vitro* sur une gamme représentative de 25 isolats cibles et de 22 isolats non-cibles dans différentes matrices (semences et feuilles). Les résultats ont montré une inclusivité et une exclusivité à 100%.

La sensibilité analytique a été évaluée par l'ISF-ISHI en nombre de copies de PepMV et en nombre de semences infectées. Un premier test a été réalisé en testant la SE-PCR sur trois gammes de dilution d'un macérat de semences saines spikés avec des feuilles infectées par PepMV. Un second test a été réalisé en testant la SE-PCR sur des échantillons de 1000 semences contenant 100, 10 ou 1 semences infectées (3 répétitions par niveau d'infection). Dans ces deux essais, le nombre de copies de PepMV par µL d'ARN extraits a été calculé à l'aide d'une courbe standard, en utilisant une gamme de dilution d'ADN synthétique représentant les séquences cibles de l'ARN de PepMV. Ces essais ont montré que la SE-PCR pouvait détecter au minimum 19 à 65 copies d'ARN de PepMV dans un macérat spiké avec des feuilles contaminées et au minimum 27 à 58 copies d'ARN de PepMV dans des échantillons contenant 1 semence contaminée. La sensibilité analytique a également été évaluée au GEVES en réalisant l'analyse sur 16 échantillons de 1000 semences contenant une semence contaminée. Le nombre de copies d'ARN de PepMV a été quantifié par PCR digitale, ce qui a permis de confirmer ce niveau de sensibilité (détection de PepMV pour 1,3 à 116 copies d'ARN de PepMV).

La sensibilité et spécificité diagnostique ont été évaluées par l'ISF-ISHI en analysant 21 échantillons de statut connu (8 échantillons contaminés et 13 échantillons sains). Les résultats ont montré une sensibilité diagnostique à 100% et une spécificité diagnostique à 92,86 % (un résultat faux positif sur 13).

L'accordance a été évaluée par l'ISF-ISHI en analysant 4 lots de semences (3 répétitions par lot) avec des taux d'infections différents. Les analyses ont été réalisées à trois moments différents par le même technicien et avec le même matériel. Les résultats ont montré une accordance à 100%.

M-GEVES/SV/MO/O10, version 1.0

La concordance a été évaluée par l'ISF-ISHI lors d'un test comparatif inter-laboratoire entre 8 laboratoires participants, dont le GEVES. Chaque laboratoire a analysé 24 échantillons de 1000 semences. Les résultats ont montré une concordance à 98,6% (un résultat faux-négatif dans un laboratoire, sur un échantillon à 0,5% d'infection).

La sélectivité a été évaluée par l'ISF-ISHI en testant cinq variétés de tomates différentes. Un échantillon de 1 000 semences saines spikées avec des feuilles infectées par PepMV par variété a été analysé. Une série de dilutions a été testée pour chaque échantillon afin de déterminer le seuil de détection sur différentes variétés. Dans tous les cas, les échantillons se sont avérés positifs jusqu'à la dilution 10^{-7} pour les cinq variétés.

Par ailleurs, le GEVES a vérifié la sensibilité analytique à partir d'échantillons désinfectés à l'hypochlorite de sodium (NaOCl), ce qui a permis de valider cette méthode sur semences désinfectées (détection de PepMV pour 1,3 à 116 copies d'ARN de PepMV).

Tableau 2 : Niveaux des critères de performance de la méthode

Critère de performance		Niveau
Spécificité analytique	Inclusivité	100 % ¹
	Exclusivité	100 % ¹
Sensibilité analytique		19 à 65 copies/5 µL d'ARN extrait ¹ 1 semence contaminée/1000 semences correspondant à 27-58 copies/5 µL d'ARN extraits ¹ ou correspondant à 1,3-116 copies/5 µL d'ARN extraits ²
Sensibilité diagnostique		100 % ¹
Spécificité diagnostique		92,86 % ¹
Accordance		100 % ¹
Concordance		98,6 % ¹
Sélectivité		Validé entre différentes variétés de tomate ¹ Validé sur semences désinfectées (hypochlorite de sodium) ²

¹ Évalué par l'ISF-ISHI (Berendsen et al. 2023, 2024).

² Évalué par le GEVES (rapport de validation GEVES, 2025).

2. Avertissements et précautions de sécurité

S'agissant d'une méthode de laboratoire, il est du ressort de l'utilisateur de la présente méthode d'appliquer cette méthode dans le respect des bonnes pratiques de laboratoire. L'utilisateur est responsable de l'application des règles d'hygiène et de sécurité en conformité avec la réglementation en vigueur.

En particulier il est attiré l'attention sur le travail en condition d'exposition à des semences traitées. L'utilisateur de la présente méthode, conscient des risques associés, s'engage à s'assurer du port d'équipements de protection individuelle et/ou d'utilisation d'équipements de protection collective en fonction des risques associés aux produits de traitement appliqués sur les semences.

A l'issue des essais, il est de la responsabilité de l'utilisateur de la présente méthode de s'assurer de l'élimination des déchets dans le respect des obligations légales a minima et en visant à limiter au maximum l'impact de l'activité sur l'environnement.

Dans le cas où la méthode nécessite l'emploi de matériel, l'utilisation de tout matériel doit être faite dans le respect des prescriptions du fabricant.

3. Objet et domaine d'application

Cette méthode permet de détecter la présence d'ARN de PepMV dans un échantillon de semences de tomate (*Solanum lycopersicum*). Elle est applicable sur semences de tomates désinfectées à l'hypochlorite de sodium (NaOCl) et sur semences non traitées. Elle est applicable pour tout contrôle officiel visant à détecter PepMV sur semences de tomate.

Cette méthode permet de détecter PepMV par SE-PCR dans la limite du seuil de détection de la technique employée. Les échantillons pour lesquels une réponse négative est obtenue sont considérés comme indemnes de PepMV ou infectés à un niveau trop faible pour être mis en évidence par la technique utilisée.

L'utilisation d'amorces et de sondes marquées, dont la combinaison est spécifique de PepMV, permet de détecter et d'amplifier de l'ARN génomique spécifique de ce virus. La détection s'effectue dans un extrait d'ARN total obtenu à partir de macérat de semences. Cette technique ne permet pas d'évaluer la viabilité de PepMV.

4. Termes, sigles et définitions

BaCV	Bacopa chlorosis virus
ISF-ISHI	International Seed Federation - International Seed Health Initiative
NPC-Réactif :	Negative Process Control (tampon d'extraction)
NPC-Semences :	Negative Process Control (semences)
NEC :	Negative Extraction Control (témoin négatif d'extraction d'ARN)
NTC :	Non Template Control (témoin négatif de PCR)
PAC :	Positive Amplification Control (témoin positif de PCR)
PPC :	Positive Process Control
PepMV :	Pepino mosaic virus
ORNQ :	Organisme réglementé non de quarantaine
RT-PCR :	Reverse Transcription polymerase chain reaction en temps réel
SE-PCR :	Seed Extract PCR

5. Principe de la méthode

Le principe de la méthode est présenté dans la **Figure 1** ci-dessous :

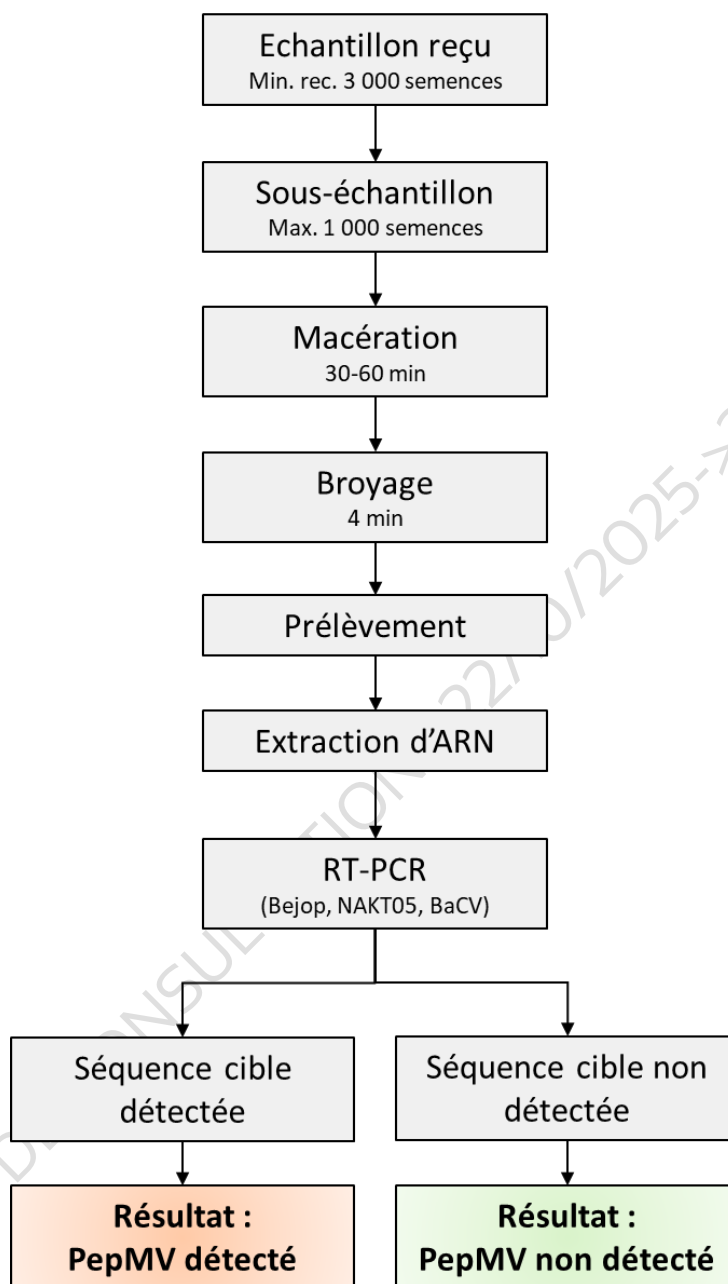


Figure 1 : Principe de la méthode de détection de pepino mosaic virus sur semences de tomate.

Rec. : recommandé. Min. : minimum. Max. : maximum. Les amorces Bejop et NAKT05 sont spécifiques de PepMV tandis que les amorces BaCV sont spécifiques de BaCV (témoin interne d'amplification spiké dans le tampon de macération).

6. Témoins, réactifs et matériels

6.1. Généralités

Le matériel de mesure utilisé doit respecter les considérations métrologiques présentées dans le **Tableau 3**. Les recommandations du fournisseur concernant les conditions de stockage et de conservation des réactifs ou du matériel doivent être suivies. Le laboratoire doit qualifier le(s) thermocycleur(s) utilisé(s). La qualification se fera sur la base des résultats obtenus par le biais d'un test biologique ou d'une vérification métrologique.

Des appellations commerciales ou fournisseurs peuvent être mentionnées dans le descriptif des réactifs ou matériels nécessaires à la mise en œuvre de la présente méthode. Cependant, des réactifs ou matériels équivalents peuvent être utilisés s'il est démontré qu'ils conduisent aux mêmes résultats.

Tableau 3 : Considérations métrologiques concernant le matériel et les réactifs utilisés dans cette méthode.

Paramètre		Ecart maximal toléré
Volume	< 10mL	± 10 %
	≥ 10 mL	± 5 %
Masse		± 10 %
pH		± 0.3
Température	Incubateur	± 3 °C
	Réfrigérateur	5°C (± 4 °C)
	Congélateur	≤ -18 °C
	Serre/module climatique	± 5°C
Temps		± 10 %

6.2. Témoins

Les témoins présentés dans le **Tableau 4** doivent être mis en place au cours de l'analyse.

Tableau 4 : Témoins à mettre en place lors d'une analyse

Etape	Nom		Composition
Macération, stomachage	NPC-réactif	Negative Process Control – tampon d'extraction	Tampon d'extraction spiké avec BaCV (Ct BaCV recommandé entre 28-32)
	NPC-semences	Negative Process Control – semences	Semences de tomate saines pour PepMV
	PPC	Positive Process Control	Semences de tomate infectées par PepMV ou Semences de tomate spikées avec PepMV (Ct Bejop et NAKTO5 recommandés entre 28-32)
Extraction d'ARN, RT-PCR	NTC	No Template Control	Eau ultrapure utilisée pour le mix RT-PCR
	PAC	Positive Amplification Control	ARN de PepMV

6.3. Réactifs

6.3.1. Macération et broyage

- Semences de tomate saines pour PepMV (NPC-semences)
- Semences de tomate infectées par PepMV, ou spikées avec PepMV (PPC). En cas de spiking, des feuilles de tomates infectées par PepMV lyophilisées peuvent être utilisées (lors de la validation les feuilles infectées ont été commandées sur le site Prime Diagnostics®)
- Tampon d'extraction (**Annexe A**)
- Extrait de feuilles infectées par bacopa chlorosis virus (BaCV) lyophilisées (lors de la validation les feuilles infectées ont été commandées sur le site DSMZ)

6.3.2. Extraction d'ARN

- Kit d'extraction d'ARN (lors de la validation deux kits d'extraction ont été validés : kit RNeasy Plant Mini Kit - Qiagen, kit Maxwell HT Simply RNA custom Kit - Promega)

6.3.3. Détection par RT-PCR

- Mélange pour RT-PCR (la validation de cette méthode a été réalisée avec le mix UltraPlex 1-step ThermoFisher - Quantabio)
- Eau ultra pure de qualité suffisante pour une utilisation en biologie moléculaire (NTC)
- Amorces et sondes pour l'amplification de portions du génome de PepMV (**Tableau 5**)
- Amorces et sonde pour l'amplification d'une portion du génome de BaCV (virus utilisé comme témoin d'amplification, **Tableau 5**)
- ARN de PepMV (PAC)

Tableau 5 : Liste des amorces et sondes nécessaires pour la RT-PCR. Les amorces et sondes Bejop, KLO5 et NAKTO5 permettent d'amplifier une portion du génome de PepMV, tandis que les amorces et la sonde NEC BaCV permettent d'amplifier une portion du génome de BaCV. Les fluorophores peuvent être adaptés.

Nom	Séquence (5' – 3')	Source
Bejop 133	ATC AAT TGT CCT TAT GCG CT	Bejo Zaden B. V., Pays-Bas
Bejop 134	ATC AAT TGT CCT TAC GCG CT	
Bejop 135	ATC AAT TGT CCC TAT GCG CT	
Bejop 136	ATC AAC TGT CCT TAT GCG CT	
Bejop 137	VIC – ACA CCC TTG AGA ATC TTG GTG TCA CAA T – BHQ1	
Bejop 138	VIC – ACA CCC TTG AGA ATT TAG GTG TCA CAA T – BHQ1	
Bejop 139	GTT TGA ATT GCA TGA GGG TT	
Bejop 140	TTG GAT TGC ATG GGG RTT	
KLO5_48	ACT CCT AGA GCT GAC CTC AC	Ling 2007
KLO5_49	ACT CCT AGA GCT GAT CTT AC	
KLO5_51	TCT CCA GCA ACA GGT TGG TA	
KLO5_52	TCA CCT GCA ACT GGT TGA TA	
NAKTO5_50	6FAM – TGT CAG CTT GCA TTT ACT TC – MGB NFQ	Naktuinbow, Pays-Bas (adapté de Ling 2007)
NEC BaCV F	CGA TGG GAA TTC ACT TTC GT	Naktuinbow, Pays-Bas
NEC BaCV R	AAT CCA CAT CGC ACA CAA GA	
NEC BaCV-P	TxR – CAA TCC TCA CAT GAT GAG ATG CCG – BHQ2	

6.4. Matériel

6.4.1. Macération et broyage

- Sachets de macération avec filtre (exemple : BagPage + de 400 mL, porosité du filtre : 280 µm, Interscience)
- Broyeur à palettes (exemple : Bagmixer 400 CC de Interscience)
- Micropipettes

6.4.2. Extraction d'ARN

- Microtubes de 1,5 mL
- Micropipettes

6.4.3. Détection par RT-PCR

- Thermocycleur pour PCR en temps réel capable de mesurer la fluorescence des fluorophores présents sur les sondes
- Micropipettes
- Cônes à filtre de volume adapté aux micropipettes utilisées
- Plaques ou microtubes pour RT-PCR en temps réel adaptés au thermocycleur

7. Échantillons

7.1. Taille, conditionnement

L'échantillon doit être envoyé dans un contenant fermé de façon étanche pour éviter la perte des semences.

Taille minimum recommandée d'un échantillon : 3 000 semences

Taille maximum d'un sous-échantillon : 1 000 semences

7.2. Conservation

Dès sa réception, l'échantillon doit être conservé à environ 10°C de façon étanche. Il est aussi possible de conserver les échantillons au réfrigérateur.

Les broyats de semences peuvent être conservés au congélateur jusqu'à 7 jours avant l'étape d'extraction d'ARN.

7.3. Critères d'acceptation

Il est de la responsabilité du préleveur de fournir un échantillon représentatif du lot de semences à analyser. L'échantillon doit être en parfait état de conservation et contenu dans un sachet fermé sans humidité.

Cette méthode est applicable sur semences non traitées ou désinfectées à l'hypochlorite de sodium, elle n'a pas été validée sur semences traitées par pelliculage ou enrobage. Néanmoins, lorsque la méthode est appliquée sur semences traitées et que les témoins sont conformes, l'analyse peut être validée. En effet, le témoin interne d'amplification représenté par BaCV permet de vérifier l'absence d'antagonisme et/ou d'inhibition lors de l'analyse. La méthode n'est pas applicable sur semences enrobées (semences recouvertes d'un enrobage de telle sorte que la plupart du temps les semences ne peuvent pas être identifiées sans retirer le matériel d'enrobage).

Il est recommandé de fournir la MMS (masse de 1 000 semences) de l'échantillon. La MMS peut être déterminée par comptage et pesée de 3 x 1 000 semences ou par un autre système validé.

8. Mode opératoire

8.1. Prise d'essai

Vérifier le nombre de semences fournies par le demandeur à l'aide du poids et de la MMS fournie par le demandeur ou évaluée par le laboratoire d'analyse. Si nécessaire, préparer les sous-échantillons en prélevant 1 000 semences maximum par pesée.

8.2. Macération

1. Pour chaque sous-échantillon, disposer les semences dans un sachet de broyage à filtre.
2. Préparer 40 mL de tampon d'extraction par sous-échantillon, PPC et NPC-semences inclus.
3. Spiker le tampon d'extraction avec BaCV. Il est recommandé d'obtenir un Ct BaCV entre 28 et 32. La quantité de BaCV à spiker doit être déterminée au préalable. Lors des essais de validation : 50 µL de BaCV ont été spikés dans 40 mL de tampon d'extraction. Le tampon d'extraction spiké peut être conservé pendant 1 mois au réfrigérateur.
4. Ajouter 40 mL de tampon d'extraction spiké dans le sachet de chaque sous-échantillon, PPC et NPC-semences. Conserver une partie du tampon d'extraction spiké pour le NPC-réactif.
5. Laisser les sachets macérer pendant 30 à 60 minutes à température ambiante.

8.3. Broyage

1. Broyer chaque sous-échantillon dans le broyeur à palettes pendant environ 4 minutes jusqu'à obtention de particules blanches résultant de l'endosperme (**Figure 2**). L'intensité et la durée du broyage doivent être adaptées pour obtenir un macérât laiteux avec apparition de particules blanches issues de l'endosperme des semences sans écrasement complet des semences. Sur un même sachet, le broyage peut être répété si nécessaire.

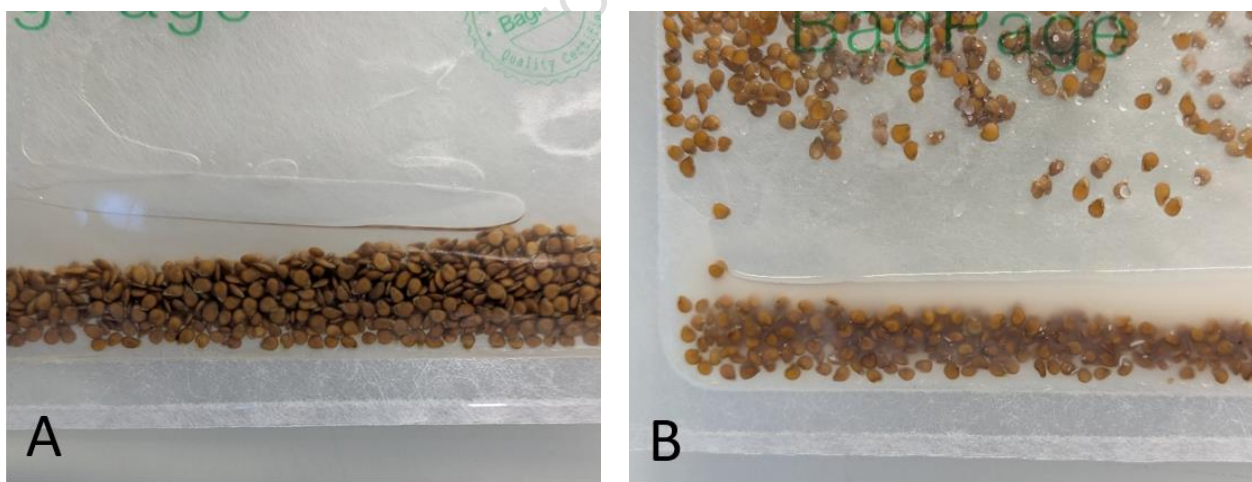


Figure 2 : Photos d'un sous-échantillon de 1 000 semences de tomate avant et après l'étape de broyage. Sous-échantillon de 1 000 semences avant broyage (A) et après broyage (B) (Photos GEVES).

2. Prélever la quantité de broyat de l'échantillon nécessaire pour l'étape d'extraction d'ARN dans un tube de 1,5 mL avec la micropipette correspondant au volume à prélever.

Les tubes peuvent être stockés au congélateur pendant 7 jours maximum avant l'étape suivante.

8.4. Extraction

Extraire l'ARN avec le kit d'extraction d'ARN en suivant les recommandations du kit d'extraction (la méthode a été validée avec le kit RNeasy Plant Mini Kit de Qiagen et le kit Maxwell HT Simply RNA custom Kit - Promega). Si besoin, les ARN extraits peuvent être stockés au congélateur jusqu'à l'étape de RT-PCR.

8.5. Détection par RT-PCR

8.5.1. Réalisation de la RT-PCR

La RT-PCR en triplex est réalisée avec les amorces et sondes décrites au paragraphe 6.3.3. Trois PCR (triplex) sont réalisées en même temps : Bejop, NAKTO5 et BaCV. Cette RT-PCR triplex est réalisée en deux répétitions pour l'ARN de chaque sous-échantillon. Les témoins à mettre en place pour cette étape sont présentés dans le **Tableau 4**. Des exemples du mélange réactionnel et du programme PCR à suivre sont présentés dans le **Tableau 6** et le **Tableau 7** respectivement.

Tableau 6 : Exemple de mélange réactionnel pour la RT-PCR.

La composition du mélange peut être adaptée sous réserve d'avoir été validée.

Réactif	Concentration mère	Volume (µL)	Concentration finale
H ₂ O	-	5.469	-
UltraPlex 1-step Toughmix	4 X	6.25	1 X
Bejop 133	10 µM	0.25	0.1 µM
Bejop 134	10 µM	0.25	0.1 µM
Bejop 135	10 µM	0.25	0.1 µM
Bejop 136	10 µM	0.25	0.1 µM
Bejop 137	10 µM	0.50	0.2 µM
Bejop 138	10 µM	0.50	0.2 µM
Bejop 139	10 µM	1.50	0.6 µM
Bejop 140	10 µM	1.50	0.6 µM
KLO5_48	10 µM	0.50	0.2 µM
KLO5_49	10 µM	0.50	0.2 µM
NAKTO5_50	10 µM	0.50	0.2 µM
KLO5_51	10 µM	0.50	0.2 µM
KLO5_52	10 µM	0.50	0.2 µM
NEC BaCV F	10 µM	0.3125	0.125 µM
NEC BaCV R	10 µM	0.3125	0.125 µM
NEC BaCV-P	10 µM	0.156	0.0625 µM
Volume du mélange :		20	
Volume de matrice :		5	
Volume total :		25	

Tableau 7 : Exemple de programme PCR à suivre pour la RT-PCR.

Les conditions de réaction peuvent être adaptées.

Etape	Température	Durée	Nombre de cycle
1 - Réaction de RT	50 °C	10 minutes	1
2 - Dénaturation	95 °C	3 minutes	1
3 - Hybridation et élongation	95 °C	10 secondes	40
	60 °C	60 secondes	

8.5.2. Interprétation des résultats

Toute valeur Ct doit être accompagnée d'une courbe exponentielle pour être prise en compte. La valeur de Ct doit être fixée au-dessus du bruit de fond (background). La détermination du Ct peut être faite automatiquement avec le logiciel associé au thermocycleur ou manuellement.

Vérifier la conformité des témoins selon le **Tableau 8**, pour pouvoir interpréter les résultats des échantillons. Le Ct de Bejop et le Ct de NAKT sont considérés positifs s'ils sont ≤ 37 , tandis que le Ct BaCV est considéré positif s'il est ≤ 32 . Ces seuils de Ct peuvent être adaptés par le laboratoire sous réserve d'avoir validé cette adaptation.

Tableau 8 : Résultats de RT-PCR attendus pour les témoins.

Les cases noires indiquent que le Ct n'a pas d'influence sur l'interprétation. Les seuils de Ct Bejop, NAKT05 et BaCV peuvent être adaptés par le laboratoire sous réserve d'avoir validé cette adaptation. « - » : négatif, « + » : positif.

Témoin	Ct Bejop	Ct NAKT05	Ct BaCV	Conclusion
NPC-Réactif	- (> 37)	- (> 37)	+ (≤ 32)	Conforme
	Autres résultats			Non conforme
NPC-Semences	- (> 37)	- (> 37)	+ (≤ 32)	Conforme
	Autres résultats			Non conforme
PPC	+ (≤ 37) pour au moins un couple d'amorces			Conforme
	Autres résultats			Non conforme
NTC	- (> 37)	- (> 37)	- (> 32)	Conforme
	Autres résultats			Non conforme
PAC	+ (≤ 37)	+ (≤ 37)		Conforme
	Autres résultats			Non conforme

Concernant les résultats des sous-échantillons, les Ct de chaque puits sont analysés selon la règle de décision présentée dans le **Tableau 9** puis le résultat de chaque sous-échantillon est analysé selon la règle de décision présentée dans le **Tableau 10**.

En cas de résultats discordants entre les deux répétitions d'un sous-échantillon (+/- ou +/- Indéterminé ou -/Indéterminé ou Indéterminé/Indéterminé), le sous-échantillon est déclaré « Indéterminé » et la RT-PCR et/ou l'extraction d'ARN doivent être reprises.

À la suite de cette reprise, les résultats de la première RT-PCR et de la deuxième RT-PCR (reprise) sont pris en compte pour statuer sur le résultat du sous-échantillon (**Tableau 11**). À partir de deux répétitions positives sur 4, le sous-échantillon est déclaré positif.

Concernant le résultat de l'échantillon, si au moins un sous-échantillon est positif, l'échantillon est déclaré positif. Si l'ensemble des sous-échantillons sont négatifs, l'échantillon est déclaré négatif.

Tableau 9 : Règles de décision concernant les résultats RT-PCR par répétition.

Les cases noires indiquent que ce Ct n'a pas d'influence sur l'interprétation. Les seuils de Ct Bejop, NAKT05 et BaCV peuvent être adaptés par le laboratoire sous réserve d'avoir validé cette adaptation.

Ct Bejop	Ct NAKT05	Ct BaCV	Résultat de la répétition
+ (≤ 37)	+ (≤ 37)		+
+ (≤ 37)	- (> 37)		+
- (> 37)	+ (≤ 37)		+
- (> 37)	- (> 37)	+ (≤ 32)	-
- (> 37)	- (> 37)	- (> 32)	Indéterminé ^a

^a Si des résultats « Indéterminé » sont obtenus : refaire tout ou une partie de l'analyse sur le(s) échantillon(s) concerné(s).

Tableau 10 : Règles de décision concernant les résultats RT-PCR par sous-échantillon.

Sous-échantillon		Interprétation
Répétition 1	Répétition 2	
+	+	Résultat positif : séquence de PepMV détectée.
+	-	Résultat indéterminé : reprise de la PCR (voir tableau 11)
-	-	Résultat négatif : séquence de PepMV non détectée.

Tableau 11 : Règle de décision en cas de reprise à la suite d'un résultat indéterminé sur un sous-échantillon.

	Sous-échantillon	Répétition	Codification répétition	Codification	Conclusion
Cas n°1	Première RT-PCR	Rep 1	+	Indéterminé	1 répétition positive sur 4 : sous-échantillon négatif
		Rep 2	-		
	Reprise	Rep 1	-	Négatif	
		Rep 2	-		
Cas n°2	Première RT-PCR	Rep 1	+	Indéterminé	2 répétitions positives sur 4 : sous-échantillon positif
		Rep 2	-		
	Reprise	Rep 1	+	Indéterminé	
		Rep 2	-		
Cas n°3	Première RT-PCR	Rep 1	+	Indéterminé	3 répétitions positives sur 4 : sous-échantillon positif
		Rep 2	-		
	Reprise	Rep 1	+	Positif	
		Rep 2	+		

9. Résultats

Le rapport doit indiquer :

- Le nombre de semences de l'échantillon
- Le nombre de semences des sous-échantillons
- Le nombre de sous-échantillons analysés (Y)
- Le nombre de sous-échantillons positifs (X)

Dans le cas d'un résultat final positif le rapport indiquera :

« Séquence cible de pepino mosaic virus détectée dans X sous-échantillon(s) sur Y sous-échantillons(s) analysé(s) »

Dans le cas d'un résultat final négatif le rapport indiquera :

« Séquence cible de pepino mosaic virus non détecté »

Dans le cas d'un résultat indéterminé le rapport indiquera :

« Indéterminé »

10. Devenir des reliquats d'échantillon après analyse

Durant l'analyse, les broyats sont conservés au congélateur jusqu'à l'obtention du résultat. Un reliquat d'ARN peut être conservé dans des conditions qui permettent une possible reprise.

11. Annexe

Annexe A : Composition du tampon d'extraction

La composition du tampon d'extraction est indiquée dans le **Tableau 12** ci-dessous. Ce tampon doit être autoclavé avant utilisation. Il peut se conserver pendant 1 mois au réfrigérateur.

Tableau 12 : Composition du tampon d'extraction

Composant	Quantité par litre
KH_2PO_4	200 mg
KCl	200 mg
$\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$	2.9 g
NaCl	8 g

VERSION DE CONSULTATION - 22/10/2025 -> 22/11/2025

12. Bibliographie

- Berendsen, S. M. H., Speksnijders, Y., Pannu S., Viles A. M., and Baldwin T. K., 2023. Detection of Pepino mosaic virus (PepMV) in Tomato Seed by Seed Extract RT-qPCR (SE-qPCR), Validation report of ISF.
- Berendsen, S. M. H., Thomas, L. A., Woudenberg, J. H. C., Speksnijders, Y., Jonkers, W., Pannu, S., et al. 2024. Development and validation of a multiplex real-time RT-PCR test for the screening of tomato (*Solanum lycopersicum*) for the detection of pepino mosaic virus. EPPO Bull. :1–9.
- Córdoba-Sellés, M. D. C., García-Ránde, A., Alfaro-Fernández, A., and Jordá-Gutiérrez, C. 2007. Seed transmission of Pepino mosaic virus and efficacy of tomato seed disinfection treatments. Plant Dis. 91:1250–1254.
- EPPO Global database <https://qd.eppo.int/taxon/PEPMVO/hosts>
- Hanssen, I. M., Mumford, R., Blystad, D. R., Cortez, I., Hasiów-Jaroszewska, B., Hristova, D., et al. 2010. Seed transmission of Pepino mosaic virus in tomato. Eur. J. Plant Pathol. 126:145–152.
- Hanssen, I. M., Paeleman, A., Vandewoestijne, E., Van Bergen, L., Bragard, C., Lievens, B., et al. 2009. Pepino mosaic virus isolates and differential symptomatology in tomato. Plant Pathol. 58:450–460.
- Hanssen, I. M., and Thomma, B. P. H. J. 2010. Pepino mosaic virus: A successful pathogen that rapidly evolved from emerging to endemic in tomato crops. Mol. Plant Pathol. 11:179–189.
- Jones, R.A.C., Koenig, R. and Lesemann, D.E. (1980), Pepino mosaic virus, a new potexvirus from pepino (*Solanum muricatum*). Annals of Applied Biology, 94: 61-68.
- Ling, K. S. 2007. 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. 2008. Pepino mosaic virus on tomato seed: Virus location and mechanical transmission. Plant Dis. 92:1701–1705.
- Méthode ISF-ISHI, Detection of Pepino mosaic virus (PepMV) in Tomato Seed, version 6, Juin 2023.
- Moreno-Pérez, M. G., Pagán, I., Aragón-Caballero, L., Cáceres, F., Fraile, A., and García-Arenal, F. 2014. Ecological and Genetic Determinants of Pepino Mosaic Virus Emergence. J. Virol. 88:3359–3368.
- Rapport de validation GEVES ANA/PAT/VAL/MET/E/054, 2025.
- Règlement d'exécution (UE) 2019/2072 du 28 novembre 2019 (journal officiel de l'Union Européenne), version consolidée du 23/07/2025.
<https://eur-lex.europa.eu/legal-content/FR/ALL/?uri=CELEX%3A32019R2072>
- Règlement (UE) 2016/2031 du 26 octobre 2016 (journal officiel de l'Union Européenne), version consolidée du 05/01/2025.
<https://eur-lex.europa.eu/legal-content/FR/TXT/?uri=celex%3A32016R2031>
- Van der Vlugt RAA, Stijger CCMM, Verhoeven JTJ, Lesemann DE. 2000. First Report of Pepino Mosaic Virus on Tomato. Plant Dis. 84(1):103.