Méthode d'analyse en santé des végétaux

RÉFÉRENCE : ANSES/LSV/MA059- Version 3

Septembre 2026

Détection de *Elsinoë fawcettii, Elsinoë citricola, Elsinoë australis et Pseudocercospora angolensis* par PCR en temps réel multiplex

(Photos : ANSES- LSV- Unité de Mycologie)

Laboratoire de la santé des végétaux

Laboratoire national de référence "tous champignons sur toutes matrices sauf exceptions mentionnées dans l'arrêté du 30 mars 2023"

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 de l'Anses. Toute reproduction, qu'elle soit totale ou partielle, n'est autorisée qu'à la condition expresse que la source soit citée, par exemple en faisant mention de sa référence (incluant sa version et année) et de son titre.

ANSES/FGE/0139 [version e]
plan de classement PR3/ANSES/7

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		2018	Version initiale
v2*	majeure	2024	Mise en place de la possibilité de réaliser des recherches de tout ou partie des champignons pathogènes cibles. Prise en compte du fait que le test E. faw –F/-R/-P détecte également l'ADN de l'espèce de quarantaine UE *Elsinoë citricola*. Modification du kit enzymatique pour l'amplification par PCR temps réel suite à l'arrêt de production du kit initialement validé
v3**	majeure	2026	Règles de positivité d'un échantillon Amélioration du texte pour une plus grande clarté.

* La version 2 a fait l'objet d'une consultation du 13/09/2024 au 27/09/2024 sur le site internet de l'agence, notamment auprès des laboratoires agréés français.

** La version 3 a fait l'objet d'une consultation du 16/06/2026 au 17/07/2026 sur le site internet de l'agence, notamment auprès des laboratoires agréés français.

© Anses – 14, rue Pierre et Marie Curie - 94701 Maisons-Alfort Cedex

Avant-propos

La présente méthode a été validée par :

Anses - Laboratoire de la Santé des Végétaux, Unité de Mycologie

Laboratoire National de Référence "tous champignons sur toutes matrices sauf exceptions mentionnées dans l'arrêté du 30 mars 2023"

Adresse : Domaine de Pixérécourt, Bâtiment E, 54220 Malzéville

Contact : nancy.lsv@anses.fr

La présente version de la méthode a été rédigée en se basant sur les résultats d'un projet de recherche mené par l'unité de Mycologie du Laboratoire de la Santé des Végétaux en collaboration avec un chercheur de l'institut de recherche en phytopathologie du Caire (CRA). Ce projet visait à développer un test rapide pour la détection de trois champignons phytopathogènes de quarantaine UE sur des fruits d'agrumes (*Elsinoë fawcettii*, *Elsinoë australis* et/ou *Pseudocercospora angolensis)* (Ahmed et al., 2019). Il a été complété par des études réalisées par l'EURL Fungi and oomycetes concernant la spécificité des tests concernant l'espèce *Elsinoë citricola* réglementée de quarantaine dans l'UE.

© Anses – 14, rue Pierre et Marie Curie - 94701 Maisons-

Sommaire

Avant-propos **3**
Introduction **5**
Avertissements et précautions de sécurité **6**
1. Objet et domaine d'application **6**
2. Documents de référence **7**
3. Termes, sigles et définitions **7**
4. Principe de la méthode **8**
5. Réactifs **9**
5.1 Eau 9
5.2 Kits d'extraction d'ADN 9
5.3 Oligonucléotides 9
5.4 Pré-mix de PCR en temps réel 10
5.5 Autres consommables à usage unique 10
5.6 Contrôles et témoins 10
6. Appareillage et matériels **12**
7. Échantillons **13**
7.1 Conditions d'acceptation des échantillons 13
7.2 Conservation des échantillons avant analyse 13
7.3 Conservation des échantillons ou reliquats après analyse 13
8. Mode opératoire **14**
8.1 Préparation des échantillons pour analyse 14
8.2 Broyage des prises d'essai et extraction de l'ADN total 14
8.3 Test de détection par PCR en temps réel multiplexe 15
9. Résultats **17**
9.1 Contrôle de la validité des résultats 17
9.2 Calculs et expression des résultats 17
10. Caractéristiques de performance de la méthode **19**
Annexe 1 ..... **23**
Symptômes de *Elsinoë fawcettii* **23**
Symptômes de *Elsinoë australis* **24**
Symptômes de *Pseudocercospora angolensis* **24**
Bibliographie **25**

© Anses – 14, rue Pierre et Marie Curie - 94701 Maisons-Alfort Cedex

Introduction

Elsinoë fawcettii Bitancourt & Jenkins, 1936, *Elsinoë australis* Bitancourt & Jenkins, 1936, *Elsinoë citricola* Fan, R.W. Barreto & Crous et *Pseudocercospora angolensis* (T. Carvalho & O. Mendes) Crous & U. Braun (Pretorius et al., 2003) sont des champignons phytopathogènes causant des maladies sur agrumes et pouvant occasionner des dégâts importants dans les régions où ils se sont établis. *E. fawcettii et E. citricola,* agents du « Citrus scab », *E. australis*, agent du « sweet orange scab » et *P. angolensis*, agent du « leaf and fruit spot » provoquent des lésions sur la peau des fruits (cf. Annexe 1) pouvant les rendre impropres à la commercialisation et entrainer d'importantes pertes économiques.

Elsinoë fawcettii et *E. australis* sont classés comme parasites de quarantaine par l'UE (Règlement d'exécution UE 2019/2072). *E. fawcettii* est présent dans de multiples régions agrumicoles à climat humide et affecte les fruits, les feuilles et les rameaux de nombreuses espèces de *Citrus* (Timmer et al., 1996). Contrairement à *E. fawcettii,* la présence d'*E. australis* est principalement restreinte à la partie méridionale de l'Amérique du Sud et cette espèce affecte les fruits, mais pas les feuilles, de la plupart des cultivars d'oranges et de mandarines (Timmer et al.,1996). *Elsinoë citricola,* une troisième espèce récemment décrite, est désormais également classée comme organisme de quarantaine (Règlement d'exécution UE 2019/2072). Cette espèce produit les mêmes symptômes que *E. fawcettii*, et n'a pour l'instant été décrite qu'au Brésil sur *Citrus limon* et *C. latifolia* (Fan et al., 2017 ; de Andrade et al., 2026). Ces trois espèces d'*Elsinoë* ne sont pas présentes dans l'Union européenne.

Pseudocercospora angolensis est classé comme parasite de quarantaine par l'UE (Règlement d'exécution UE 2019/2072). Sa distribution est principalement localisée en Afrique subsaharienne, au Yemen et aux Comores. Bien que l'épidémiologie du parasite ne soit pas complètement connue, il semblerait que ses capacités d'infection soient favorisées par des températures chaudes et un taux d'humidité élevé. Le pathogène affecte les feuilles et les fruits d'espèces de *Citrus* et leurs hybrides. *Fortunella japonica* (Kumquat) est également décrit comme hôte tolérant à *P. angolensis*. En revanche, aucune information n'est actuellement disponible dans la littérature au sujet de la sensibilité des autres espèces de *Fortunella*, de *Poncirus* et leurs hybrides vis à vis de *P. angolensis* (EFSA, 2017). *P. angolensis* n'est pas présent dans l'Union européenne.

Cette méthode est liée à la méthode officielle d'analyse MOA 022 « Techniques qualitatives d'amplification enzymatique des acides nucléiques » : elle ne peut être appliquée qu'en respectant les préconisations de cette méthode officielle.

© Anses – 14, rue Pierre et Marie Curie - 94701 Maisons-

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.

L'exigence de confinement pour la manipulation de formes viables de ces agents pathogènes doit être en accord avec la règlementation en vigueur dans la région où se situe le laboratoire d'analyse.

Élimination des matériels susceptibles d'être contaminants :

Le laboratoire doit mettre en œuvre des mesures prenant en compte ces risques pour garantir la non dissémination des organismes nuisibles dans l'environnement.

Les tubes et autres consommables plastiques ayant été utilisés pendant la phase d'extraction - purification d'ADN total peuvent être éliminés sans traitement particulier (plus de parasite viable à ce stade).

Les tubes et autres consommables plastiques ayant été utilisés lors de la phase de préparation du mélange réactionnel et chargement des solutions d'ADN peuvent être éliminés sans traitement particulier.

1. Objet et domaine d'application

L'objet de cette méthode est de détecter la présence de *E. fawcettii/E. citricola, E. australis* et *P. angolensis* dans des tissus végétaux. La présence de ces quatre espèces est mise en évidence par un test de détection par PCR (Polymerase Chain Reaction) en temps réel utilisant une combinaison d'amorces et de sondes d'hydrolyse.

Il a été démontré expérimentalement que la combinaison de sonde et d'amorces ciblant spécifiquement l'ADN de *E. fawcettii* détectait également l'ADN de l'espèce *E. citricola,* les deux espèces partageant la même séquence du gène cible *(MS204)* (EURL Fungi and Oomycetes, communication personnelle faite aux LNRs de l'UE). Les deux espèces sont détectables par le test E. faw-F/-R/-P, mais non différenciables. Toutes deux sont de quarantaine pour l'UE. Elles seront groupées sous l'appellation « *E. fawcettii/E. citricola* » dans cette méthode.

Cette méthode est qualitative : elle permet de détecter *E. fawcettii/E. citricola, E. australis* et/ou *P. angolensis* dans la limite du seuil de détection des techniques employées, sans objectif de quantification.

© Anses – 14, rue Pierre et Marie Curie - 94701 Maisons-Alfort Cedex

Selon la demande d'analyse, cette méthode rend donc possible :

- La détection simultanée *d'E. fawcettii/E. citricola* et *E. australis seuls*,
- La détection de *P. angolensis* seul
- La détection simultanée *d'E. fawcettii/E. citricola*, *E. australis* et de *P. angolensis*

Les échantillons pour lesquels une réponse négative est obtenue sont considérés comme indemnes de l'une ou de plusieurs de ces espèces ou contaminés à un niveau trop faible pour être mis en évidence par les techniques utilisées.

Objets susceptibles d'être soumis à analyse :
Cette méthode concerne les fruits de *Citrus* spp., *Fortunella* spp. et *Poncirus* spp. ainsi que leur hybrides.

Limitation relatives aux objets susceptibles d'être soumis à l'analyse :
Cette méthode a été initialement mise au point et validée sur écorces de fruits présentant des symptômes.

Grandeur de l'objet soumis à l'analyse :
Les échantillons soumis à l'analyse seront ainsi constitués d'un à plusieurs fruits présentant des lésions caractéristiques de *E. fawcettii, E. citricola, E. australis* ou de *P. angolensis* (cf. Annexe 1).

2. Documents de référence

[1] **MOA 022 :** Techniques qualitatives d'amplification enzymatique des acides nucléiques : PCR (Polymerase Chain Reaction), RT-PCR (Reverse Transcription-PCR) et PCR temps réel. Détection 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 d'analyse 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 de la méthode d'analyse.

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 de la méthode d'analyse.

© Anses – 14, rue Pierre et Marie Curie - 94701 Maisons-

4. Principe de la méthode

Le principe de la méthode est présenté dans la figure 1 ci-après :

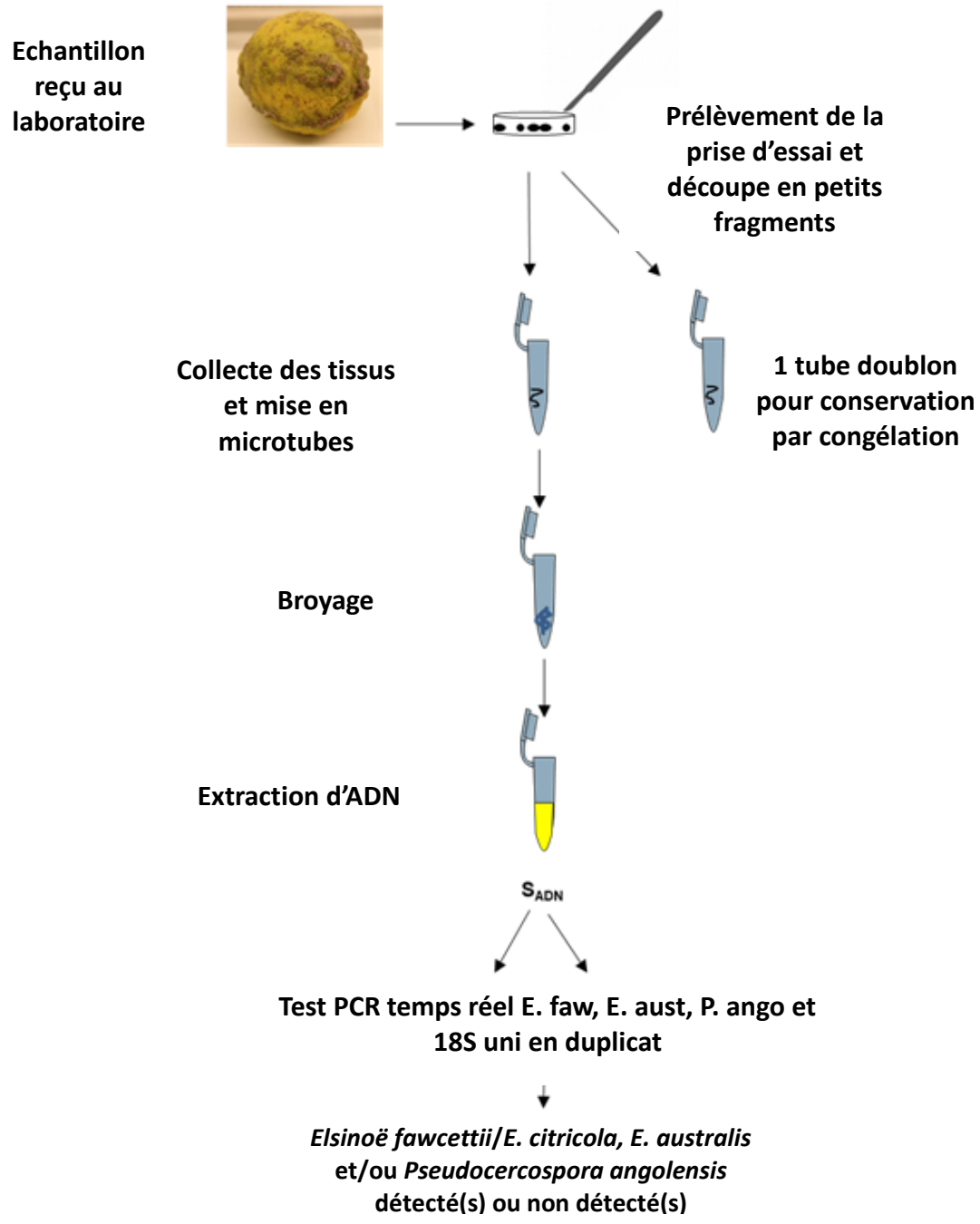


Figure 1 : Principe de la méthode de détection

© Anses – 14, rue Pierre et Marie Curie - 94701 Maisons-Alfort Cedex

5. Réactifs

<u>Avertissement</u> : 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, nettoyage, stérilisation ou tout autre traitement approprié) à l'absence dans l'eau, produits et consommables utilisés, de contamination (ADN ou ARN), de nucléase, d'inhibiteur ou de tout autre élément pouvant influer 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 satisfaisantes.

5.1 Eau

L'eau doit présenter une qualité suffisante pour une utilisation en biologie moléculaire (eau de qualité « biologie moléculaire »).

5.2 Kits d'extraction d'ADN

L'ADN total des échantillons analysés (à la fois ADN végétal et ADN de microorganismes présents sur le prélèvement) est extrait et purifié à l'aide d'un mini kit d'extraction d'ADN de plante disponible dans le commerce. Le kit d'extraction initialement validé pour cette méthode est le DNeasy® Plant Mini Kit (Qiagen) (cf Dossier LNR de validation de la méthode MIAM 011, Ahmed et al. (2019)).

5.3 Oligonucléotides

Tableau 1 : séquences des amorces et sondes utilisées dans cette méthode

Cible	Amorce ou sonde	Sequence (5'-3')
E.fawcettii/E. citricola	E.faw-F[a]	AGA GCC GGA AAG GAG CAT G
	E.faw-R[a]	GAC TGC GTG GAA GGA AAA TTG C
	E.faw-P[a]	[FAM]-TGG GGC TGT CAT CCG TCA GT- [BHQ1]
E. australis	E.aust-F[a]	TCA GCC CAT GTC CGG TAT TG
	E.aust-R[a]	CGC ACT GAT TTA TCT ACC ATT GG
	E.aust-P[a]	[ROX]-CGC GCT CGA ACT GCA CAT GGT-[BHQ2]
P. angolensis	P.ango-F[a]	CCA CAC ATT CCT CTG CTC CT
	P.ango-R[a]	AGG CAT CGT ATC AGC AAG CT
	P.ango-P[a]	[Cy5]-TGA GCA TCG ACA ACA ACA CGC T-[BHQ2]
Plante/champignon	18S uni-F[b]	GCA AGG CTG AAA CTT AAA GGA A
	18S uni-R[b]	CCA CCA CCC ATA GAA TCA AGA
	18S uni-P[b]	[JOE]-ACG GAA GGG CAC CAC CAG GAG T-[BHQ1]

[a]Ahmed et al (2019)
[b]Ines et al. (2009)

© Anses – 14, rue Pierre et Marie Curie - 94701 Maisons-

D'autres fluorophores rapporteurs peuvent être utilisés pour chaque sonde, sous réserve que le fluorophore extincteur associé soit adapté. Les amorces et sondes validées par le LNR pour cette méthode ont été synthétisées par Eurogentec.

5.4 Pré-mix de PCR en temps réel

Le kit d'amplification initialement validé pour cette méthode est le Mastermix No ROX (Eurogentec) (cf Dossier LNR de validation de la méthode MIAM 011, Ahmed et al. (2019)). Après l'arrêt définitif de sa production par le fabricant, un autre kit a été validé : le Takyon™ No ROX Probe 2X Mastermix Blue dTTP d'Eurogentec (Dossier LNR de validation de la méthode MIAM 011).

5.5 Autres consommables à usage unique

- Pointes à filtre stériles de volume adapté
- Microtubes stériles de 2 mL
- Microtubes ou capillaires stériles pour PCR de volume adapté au thermocycleur temps réel utilisé, à paroi fine, individuels, en barrette de 4, 8 ou en plaque de 96.
- Microtubes de Lysing matrix A (MP Biomedicals) ou tout autre consommable permettant d'obtenir une qualité de broyage équivalente pour le broyage des tissus végétaux (cf Dossier LNR de validation de la méthode MIAM 011).

5.6 Contrôles et témoins

La technique de détection de régions cibles d'ADN d'un organisme par la technique de PCR en temps réel impose 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 par micropipettes, les températures et durées de réaction, la concentration des solutions utilisées étaient corrects,
- l'extrait d'ADN était suffisant en quantité et amplifiable (pas d'interférence avec des composés inhibiteurs),
- qu'il n'y a pas eu de contamination accidentelle des échantillons testés.

Les contrôles à utiliser au cours de l'analyse sont *à minima* les suivants :

- **Un témoin négatif d'extraction (T-$_{extr.}$)** sera préparé pour toute série d'extractions. Une prise d'échantillon "vide", c'est-à-dire un microtube de 2 mL stérile vide, subira donc toutes les phases de l'analyse (prise d'essai-broyage-extraction-PCR) pour vérifier l'absence de contamination lors de la prise d'essai et de la phase d'extraction d'ADN (1er type de faux positif) et sera testé en *duplicata* lors de chaque réaction de PCR en temps réel E.faw, E.aust et P.ango pour vérifier l'absence de contamination croisée entre échantillons ou de contamination externe lors de la

© Anses – 14, rue Pierre et Marie Curie - 94701 Maisons-Alfort Cedex

phase d'extraction d'ADN. Le tube faisant fonction de $T-_{extr}$ doit impérativement être ouvert avant toute manipulation d'échantillons, rester ouvert pendant toute la phase de manipulation d'échantillons, et être refermé à la fin de la manipulation des échantillons, et ce à chaque étape pendant laquelle les tubes d'échantillons doivent être ouverts.

- **Un témoin positif $T+_{18S\ Citrus}$** sera systématiquement testé en *duplicata* lors de chaque réaction de PCR en temps réel 18S uni. Il permet de vérifier que la réaction PCR 18S uni s'est effectuée de façon correcte. Ce $T+_{18S\ Citrus}$ est constitué d'une solution quantifiée d'ADN d'écorce de fruits de *Citrus* à une concentration similaire à ce qui est obtenu en moyenne à partir d'échantillons à analyser.

- **Un témoin positif en limite pratique de détection ($T+_{LOD}$)** sera systématiquement testé en duplicata lors de chaque réaction de PCR en temps réel. Il permet de vérifier que la réaction PCR s'est effectuée de façon optimale (conditions thermodynamiques, volumétriques, et chimiques) pour que la plus petite quantité détectable de *E. fawcettii/E. citricola*, *E. australis* et/ou *P. angolensis* puisse avoir été détectée dans un échantillon par ce protocole. Ces quatre $T+_{LOD}$ sont chacun constitués d'une solution calibrée de plasmides bactériens dans lesquels est insérée la cible du test PCR spécifique, E.faw, E.aust et P.ango. Ces $T+_{LOD}$ doivent être caractérisés par le laboratoire dans ses propres conditions. En pratique, le $T+_{LOD}$ peut être défini comme la plus petite quantité de cible produisant un résultat positif dans 100 % des cas. Dans les conditions de validation du LNR, la limite de détection du test a été déterminée à 242, 241 et 242 copies plasmidiques de cible par tube de PCR, respectivement pour *E. fawcettii/E. citricola*, *E. australis* et *P. angolensis* (cf. Dossier LNR de validation de la méthode MIAM 011).

- **Un témoin négatif d'amplification** (**T-** ou **NTC,** no template control) sera systématiquement introduit en *duplicata* lors de chaque réaction de PCR en temps réel E.faw, E.aust et P.ango . Une prise d'échantillon "eau" subira donc toutes les phases de l'analyse à partir de la préparation du mélange réactionnel de PCR pour vérifier l'absence de contamination lors de cette phase et lors du chargement des S_{ADN} dans les tubes individuels de PCR (2^{eme} type de faux positifs).

- **Un contrôle de la qualité de l'extraction d'ADN et de la présence d'inhibiteur sera réalisé pour chaque prise d'essai.** Il prendra la forme d'un test PCR temps réel utilisant la combinaison d'amorces / sonde 18S uni -F/-R/-P. Ce test permet de générer un signal de fluorescence de nature exponentielle significativement supérieur au bruit de fond si de l'ADN de plante ou de champignon est présent dans un extrait, sans effet inhibiteur suffisant (Ioos *et al*., 2009). Toutefois, les prises d'essai qui sont positives pour au moins un des tests *E. fawcettii/E. citricola*, *E. australis* ou *P. angolensis* ne nécessiteront pas de contrôle de la qualité d'ADN. Ce test sera réalisé dans la même réaction que le test de détection *E. fawcettii/E. citricola*, *E. australis* et/ou *P. angolensis*. En revanche, l'analyse des courbes de fluorescence 18S uni-F/-R/-P se limitera aux données acquises lors des 30 premiers cycles exclusivement. Une S_{ADN} sera dite positive pour le test 18S uni si le Ct (Cycle threshold, cycle seuil) généré par les deux réplicats est inférieur au Ct_{seuil} 18S Uni, préalablement déterminée expérimentalement par le laboratoire, sur

© Anses – 14, rue Pierre et Marie Curie - 94701 Maisons-

le type de matrice testé (écorces de *Citrus* spp.) dans ses propres conditions. Dans les conditions de validation de ce test la valeur maximale acceptable de Ct pour le test 18S Uni a été déterminée à 15,84 (cf. Dossier LNR de validation de la méthode MIAM 011).

Ces contrôles ainsi que des contrôles supplémentaires que le laboratoire peut ajouter si nécessaire sont définis par la MOA 022.

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.

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

Les considérations d'ordre métrologique à appliquer sont celles de la MOA 022 ou de la norme ISO 8655 (versions en vigueur).

En plus de l'appareillage courant d'un laboratoire de biologie moléculaire, le matériel suivant est jugé nécessaire pour certaines phases de l'analyse :

- Appareil de PCR en temps réel et ordinateur de pilotage capables de mesurer la fluorescence des fluorophores de type « FAM », « ROX », « Cy5 » et « JOE » ou des fluorophores de spectres équivalents. Cette méthode a été validée sur un appareil Rotorgene 6500, Corbett Research (cf. Dossier LNR de validation de la méthode MIAM 011).
- Hotte à flux laminaire ou poste de sécurité microbiologique pour préparation du mélange réactionnel et chargement des échantillons dans les tubes de PCR (si possible deux hottes ou postes séparés).
- Broyeur de tissu orbital oscillant (de type FastPrep, MP Biomedicals) avec adaptateur et portoirs pour tubes de 2 mL. Tout autre système de broyage peut être utilisé, pourvu qu'il permette d'obtenir une qualité de broyage équivalente.

© Anses – 14, rue Pierre et Marie Curie - 94701 Maisons-Alfort Cedex

7. Échantillons

7.1 Conditions d'acceptation des échantillons

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

• **Nature et état de l'échantillon compatibles avec l'analyse** : Les échantillons sont constitués d'au moins un fruit présentant des symptômes (cf. Annexe 1). 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.

• **Confection du colis** : 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. Une signalétique « quarantaine » doit figurer sur le colis.

• **Fiche de demande d'analyse** : formulation claire de la demande, marchandise consignée ou non, identification du végétal, de l'expéditeur, référence des échantillons. Cette fiche est fixée à l'extérieur du colis.

7.2 Conservation des échantillons avant analyse

En attendant l'analyse, l'échantillon devra être conservé à 5±3°C. Si l'analyse ne peut être réalisée dans les 15 jours, des prises d'essai doivent être réalisées, et les microtubes devront être conservés congelés jusqu'à un maximum de 6 mois.

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, au minimum jusqu'au 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. Dans le cadre des missions qui lui sont confiées, le laboratoire national de référence peut demander que tout ou une partie de ces reliquats lui soient transmis, aux frais des laboratoires agréés ou reconnus.

© Anses – 14, rue Pierre et Marie Curie - 94701 Maisons-

8. Mode opératoire

8.1 Préparation des échantillons pour analyse

La préparation des échantillons pour analyse s'effectue sous un poste de sécurité microbiologique.

La prise d'essai s'effectuera sur l'écorce de fruits présentant des symptômes typiques d'une infection par *E. fawcettii/E. citricola, E. australis ou P. angolensis* ou éventuellement des symptômes douteux (cf. Annexe 1).

Les prélèvements sur écorces de fruits s'effectuent au niveau des lésions observées en utilisant des outils coupants stérilisés. Pour un échantillon donné, cibler les régions les plus pertinentes et prélever autant de portions de lésions que nécessaire afin de maximiser les chances de détecter l'un ou l'autre des parasites (cf. Annexe 1).

Les portions de lésions sont ensuite découpées, à l'aide d'une lame de scalpel stérilisée, en fragments de tissus les plus petits possible (environ 2 à 3 mm d'arête). Ces fragments sont ensuite mélangés puis transférés dans un microtube de 2 mL (lysing matrix A) en veillant à ne pas dépasser un volume représentant environ le ¼ du tube. À cette étape, il est recommandé de préparer, si possible, un tube supplémentaire contenant le reliquat de fragments, Ce dernier sera identifié et conservé congelé, afin de disposer de matériel en cas de nécessité de confirmation des cas positifs par un laboratoire de référence.

8.2 Broyage des prises d'essai et extraction de l'ADN total

Les opérations décrites ci-dessous s'effectuent en portant des gants à usage unique non talqués. La paire de gants doit être systématiquement changée au moindre contact direct avec la prise d'essai.

L'objectif du broyage de la prise d'essai est de permettre son homogénéisation et de faciliter la libération d'un maximum d'ADN total lors de l'incubation dans le tampon de lyse.

1. Déposer et ouvrir le tube faisant office de témoin négatif d'extraction sur le plan de travail pendant toute la durée de la manipulation des échantillons.

2. Avant ouverture du microtube contenant la prise d'essai**,** centrifuger brièvement le microtube afin de recueillir toutes les particules constituant l'échantillon au fond du microtube et débarrasser le capuchon de tout reliquat d'échantillon.

3. Ajouter le volume de tampon de lyse préconisé par le fabricant de kit d'extraction d'ADN dans chaque tube de prise d'essai. Si un dosage au spectrophotomètre est prévu, il sera parfois nécessaire à cette étape d'ajouter la RNase, enzyme qui dégrade les molécules d'ARN (fournie avec le kit d'extraction). Le volume à ajouter est celui préconisé par le fabricant.

4. Placer le microtube sur le portoir du broyeur Fastprep et broyer environ 1 minute à 6,5 unités. Recommencer cette étape une deuxième fois.

5. Centrifuger le microtube quelques secondes après le broyage pour recueillir l'échantillon au fond du tube et réduire la mousse.

© Anses – 14, rue Pierre et Marie Curie - 94701 Maisons-Alfort Cedex

6. Incuber chaque tube entre 15 et 20 min à environ 65°C (ou à la température recommandée par le fabricant de kit d'extraction d'ADN). Pendant l'incubation, vortexer chaque tube à au moins une reprise pour ré-homogénéiser leur contenu qui aura tendance à sédimenter.

7. A la fin de l'incubation centrifuger les tubes environ 5 min à vitesse maximale. Prélever le surnageant pour poursuivre l'extraction.

8. Le surnageant prélevé est transféré dans un nouveau microtube stérile ou dans la première colonne de filtration du kit d'extraction d'ADN. Le microtube contenant le culot cellulaire est détruit. L'extraction d'ADN se poursuit ensuite en suivant les recommandations du fournisseur du kit d'extraction d'ADN.

9. A la fin du mode opératoire prescrit par le fabricant, l'ADN total extrait est élué dans un volume final de 100 µL de tampon d'élution. Cette solution d'ADN total constituera la solution (extrait) d'ADN directement analysée par PCR en temps réel (S_{ADN}).

8.3 Test de détection par PCR en temps réel multiplexe

Préparation et distribution du mélange réactionnel de détection E. faw, E. aust, P. ango et 18S uni.

Le volume réactionnel final est 20 µL : 18 µL de mélange réactionnel et 2 µL de S_{ADN} à tester. La composition du mélange réactionnel pour une PCR quadruplex ciblant les quatre champignons est décrite dans le tableau ci-dessous.

Note 1: en cas de recherche exclusive d'*E. fawcettii/E. citricola* et *E. australis*, remplacer les amorces et la sonde du test P. ango par le même volume d'eau.

Note 2 : en cas de recherche exclusive de *P. angolensis*, remplacer les amorces et les sondes des tests E. faw et E. aust par le même volume d'eau.

Tableau 2 : composition du mélange réactionnel

Composé	Concentration finale
Eau Ultra Pure	qsp 18 µL
qPCR TakyonTM No ROX 2X MasterMix Blue dTTP (Eurogentec)	1x
Amorce sens E.faw-F	0.3 µM
Amorce antisens E.faw-R	0.3 µM
Sonde E.faw-P	0.1 µM
Amorce sens E.aust-F	0.3 µM
Amorce antisens E.aust-R	0.3 µM
Sonde E.aust-P	0.1 µM
Amorce sens P.ango-F	0.3 µM
Amorce antisens P.ango-R	0.3 µM
Sonde P.ango-P	0.1 µM
Amorce sens 18S uni-F	0.3 µM
Amorce antisens 18S uni-R	0.3 µM
Sonde 18S uni-P	0.1 µM

Le mix se prépare dans un microtube stérile de 1,5 ou 2 mL.

© Anses – 14, rue Pierre et Marie Curie - 94701 Maisons-

1. Les différents composants sont décongelés à température ambiante puis homogénéisés par vortexage.
2. Les différents composants sont ajoutés dans le microtube stérile à l'aide de micropipettes obligatoirement munies de pointes à filtre stériles.
3. Le microtube contenant le mix complet doit être passé au vortex pendant au moins 5 secondes avant sa distribution.
4. Le mix est distribué dans les microtubes de PCR à raison de 18 µL par microtube.

Addition des solutions d'ADN à tester dans les microtubes de PCR

L'addition des S_{ADN} à tester ainsi que des solutions d'ADN servant de témoins s'effectuera de préférence dans une zone physiquement séparée de la zone où se sont effectuées la préparation et la distribution du mélange réactionnel. Il est obligatoire d'utiliser un jeu de micropipettes uniquement réservé à cet effet.

1. Les différentes solutions S_{ADN} correspondant aux différentes prises d'essai sont testées en duplicata (2 tubes ou capillaires PCR individuels) à raison de 2 µL par microtube de PCR à l'aide d'une micropipette munie d'une pointe à filtre stérile.
2. Les S_{ADN} des différents contrôles sont ajoutées et testées en duplicata : $T-_{extr}$, $T+_{LOD}$, etc. Pour le T- (NTC), on substitue à la S_{ADN} 2 µL d'eau ultra pure. Il est recommandé d'ajouter les témoins positifs en fin de manipulation, après avoir refermé de façon étanche les tubes correspondants aux échantillons à tester.
3. Les microtubes sont transférés dans le bloc ou le rotor du thermocycleur.

Paramètres de l'amplification par PCR en temps réel

Les différents paramètres de la PCR en temps réel pour la détection de *E. fawcettii/E. citricola, E. australis* et / ou *P. angolensis* sont les suivants (Ahmed et al., 2019)

Etape		Température de consigne	Durée programmée	Nombre de cycles
1	Dénaturation initiale et activation de la polymérase à ADN	95 °C *	3 min *	1
2	Dénaturation	95°C	15 sec	40
3	Hybridation - polymérisation	60°C	55 sec puis mesure des différentes fluorescences	

* Durée et température à adapter en fonction des recommandations du fournisseur

© Anses – 14, rue Pierre et Marie Curie - 94701 Maisons-Alfort Cedex

A la fin de l'amplification par polymérisation en chaîne, les tubes de PCR sont évacués et détruits.

9. Résultats

9.1 Contrôle de la validité des résultats

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.

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

a) Aucun des réplicats de $T-_{extr}$ n'a généré de valeur de Ct pour le test cible => il n'y a pas eu de contamination croisée accidentelle pendant la phase de broyage et d'extraction d'ADN de la série des échantillons analysés ou pendant la préparation du mélange réactionnel, sa distribution et l'ajout des S_{ADN}.

b) Aucun des réplicats de T- (NTC) n'a généré de valeur de Ct pour le test cible => il n'y a pas eu de contamination accidentelle pendant la préparation du mélange réactionnel, sa distribution et l'ajout des S_{ADN}.

c) Les réplicats de $T+_{LOD}$ ont chacun généré une valeur de Ct pour le test cible => les conditions de PCR et la composition du mélange réactionnel de PCR ont permis d'amplifier spécifiquement et avec une performance optimale la séquence cible chez *E. fawcettii/E. citricola, E. australis* et/ou *P. angolensis*.

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.

9.2 Calculs et expression des résultats

Si la série d'analyse est validée, les résultats peuvent être considérés comme interprétables pour l'ensemble des S_{ADN}, donc des prises d'essai et de leur réplicats, testés au cours de la même réaction de PCR.

Pour établir le statut d'un échantillon (positif, négatif ou indéterminé), relever le Ct moyen du contrôle $T+_{LOD}$ ($Ctmoy_{LOD}$) puis pour chacun des tests et chacune des prises d'essais, relever le Ct de chaque réplicat :

- Un réplicat d'un extrait d'ADN testé dont le Ct est inférieur ou égal au $Ctmoy_{LOD}$ est considéré comme positif pour le test cible.
- Un réplicat d'un extrait d'ADN testé dont le Ct généré est inférieur ou égal à la valeur de Ct 18S Uni maximale déterminée expérimentalement par le laboratoire est considéré comme positif pour le test 18S Uni.

© Anses – 14, rue Pierre et Marie Curie - 94701 Maisons-

L'analyse des résultats pour une prise d'essai, ainsi que les règles de décision applicables sont présentées ci-dessous dans les tableaux 1 et 2.

Tableau 1 : PCR cible/18S Uni réalisées sur S_{ADN}

Test cible		**Test 18S Uni**		**Décision et résultat**
Réplicat 1	Réplicat 2	Réplicat 1	Réplicat 2	
+	**+**	***n.a.**	**n.a.**	**Arrêt de l'analyse : agent pathogène détecté (*E. fawcettii*/*E. citricola* ou *E. australis* ou *P. angolensis*)**
-	-	+	+	**Arrêt de l'analyse : agent pathogène non détecté au seuil de détection de la méthode (*E. fawcettii*/*E. citricola* ou *E. australis* ou P. *angolensis*)**
-	-	-	-	Refaire la PCR multiplexe sur **S_{ADN} diluée 10 fois** et suivre le tableau 2 pour les règles décisionnelles
+	-	+	-	Refaire la PCR multiplexe Uni, si de nouveau un seul réplicat sur les deux génère une valeur positive pour les deux tests, des analyses complémentaires[1] devront être entreprises par le LNR
+	-	+	+	Refaire uniquement la PCR cible en triplicat. A l'issue de ce test, si ▪ Au moins 2 réplicats sur 3 ont un Ct ≤ au Ctmoy $_{LOD}$, alors arrêt de l'analyse => **agent pathogène détecté (*E. fawcettii*/*E. citricola* ou *E. australis* ou *P. angolensis*)** ▪ Au moins 2 réplicats sur 3 ont un Ct> au Ctmoy $_{LOD}$, alors arrêt de l'analyse => **agent pathogène non détecté au seuil de détection de la méthode (*E. fawcettii*/*E. citricola* ou *E. australis* ou *P. angolensis*)**

***n.a. : les données ne sont pas à analyser**

[1] Les analyses complémentaires peuvent par exemple consister en une analyse par PCR temps réel ou conventionnelle ciblant des marqueurs différents, ou en une analyse par séquençage de l'amplicon obtenu.

© Anses – 14, rue Pierre et Marie Curie - 94701 Maisons-Alfort Cedex

Tableau 2 : PCR cible/18S Uni réalisées sur S_{ADN} diluée au 1/10e

Test cible		Test 18S Uni		Décision et résultat
Réplicat 1	Réplicat 2	Réplicat 1	Réplicat 2	
+	+	*n.a.	n.a.	**Arrêt de l'analyse : agent pathogène détecté (*E. fawcettii/E. citricola* ou *E. australis* ou *P. angolensis*)**
-	-	+	+	**Arrêt de l'analyse : agent pathogène non détecté au seuil de détection de la méthode (*E. fawcettii/E. citricola* ou *E. australis* ou *P. angolensis*)**
-	-	-	-	Si l'échantillon le permet, refaire de nouvelles prises d'essai. **Sinon, arrêt de l'analyse : résultat indéterminé[2]**
+	-	+	-	Refaire la PCR multiplexe, si de nouveau un seul réplicat sur les deux génère une valeur positive pour les deux tests, des analyses complémentaires[1] devront être entreprises par le LNR
+	-	+	+	Refaire uniquement la PCR cible en triplicat. A l'issue de ce test, si ▪ Au moins 2 réplicats sur 3 ont un Ct ≤ au Ctmoy $_{LOD}$, alors arrêt de l'analyse => **agent pathogène détecté (*E. fawcettii/E. citricola* ou *E. australis* ou *P. angolensis*)** ▪ Au moins 2 réplicats sur 3 ont un Ct> au Ctmoy $_{LOD}$, alors arrêt de l'analyse => **agent pathogène non détecté au seuil de détection de la méthode (*E. fawcettii/E. citricola* ou *E. australis* ou *P. angolensis*)**

***n.a. : les données ne sont pas à analyser**

10. Caractéristiques de performance de la méthode

Synthèse des caractéristiques de performance extraite du dossier de validation établi par le LNR « tous champignons sur toutes matrices sauf exceptions mentionnées dans l'arrêté du 30 mars 2023 » sous la référence MIAM 011.

Les valeurs de performances ont été initialement obtenues avec le qPCR Mastermix No ROX (Eurogentec). Certaines ont été revalidées avec le qPCR Takyon™ No ROX Probe 2x Mastermix Blue dTTP (Eurogentec), comme indiqué le cas échéant.

Critère de performance	Résultats obtenus

[2] Si possible, doser la quantité d'ADN afin de mentionner la cause de l'indétermination (présence de composés inhibiteurs ou quantité d'ADN extrait insuffisante).

© Anses – 14, rue Pierre et Marie Curie - 94701 Maisons-

<table>
<tr><td>Caractéristiques de la réaction de PCR en temps réel</td><td>L'efficacité (E) de la réaction quadruplex sur une gamme de solutions plasmidiques calibrées diluées dans du TE(1x), a été évaluée à :
- E. fawcettii : 102% (R^2=0,9999)
- E. australis : 92,09% (R^2=0,9985)
- P. angolensis : 98,72% (R^2=0,9997)

Lorsque la gamme est préparée dans de l'ADN de Citrus limon à 1ng/µL, l'efficacité a été évaluée à :
- E. fawcettii : 99,26% (R^2=0,9997)
- E. australis : 97,49% (R^2=0,9998)
- P. angolensis : 97,33% (R^2=0,9993)

Lorsque la gamme est préparée dans de l'ADN de Citrus sinensis à 1ng/µL, l'efficacité a été évaluée à :
- E. fawcettii : 101,34% (R^2=0,9996)
- E. australis : 97,07% (R^2=0,9999)
- P. angolensis : 98,62% (R^2=0,9998)

Aucune différence significative d'efficacité ni de R^2 n'a été constatée lorsque les 3 cibles ont été testées diluées dans du TE (1x) ou dans de l'ADN de Citrus.</td></tr>
<tr><td>Sensibilité analytique</td><td>La sensibilité analytique a été estimée à $4,84.10^3$, $4,82.10^3$et $4,84.10^3$ copies plasmidiques d'ADN cible (respectivement pour E. fawcettii, E. australis et P. angolensis) par tube de PCR (soit 242, 241 et 242 cp/µL) pour une réaction quadruplex avec dilution dans du TE (1x) en utilisant le qPCR Takyon™ No ROX Probe 2x Mastermix Blue dTTP (Eurogentec).</td></tr>
<tr><td>Spécificité analytique</td><td>La spécificité analytique a été évaluée in vitro sur 103 isolats de différentes espèces génétiquement proches de l'une ou l'autre des 3 cibles ou rencontrées couramment sur Citrus.

Les tests sont spécifiques de leur cible, mis à part le test E. faw-F/-R/-P qui amplifie également l'ADN de la troisième espèce de quarantaine UE Elsinoë citricola ; la séquence cible est en effet identique chez les deux espèces (EURL fungi and oomycetes, communication personnelle).</td></tr>
<tr><td>Inclusivité</td><td>L'inclusivité du test PCR en temps réel a été démontrée in vitro sur un panel représentatifs d'isolats de E. fawcettii (32 isolats), E. australis (6 isolats) et P. angolensis (6 isolats), en provenance de plusieurs continents et obtenus sur différentes espèces de Citrus.

Toutes les souches de E. fawcettii, E. australis et P. angolensis testées sont détectées par leur test respectif, quelle que soit leur origine.</td></tr>
<tr><td>Répétabilité et reproductibilité</td><td>La répétabilité et la reproductibilité ont été évaluées sur 10 réplicats d'une solution plasmidique calibrée, dosée à 3 concentrations proches de la LOD et sur 10 réplicats d'un extrait d'ADN génomique de l'espèce cible, préalablement normalisé à 1 ng/µL.

Les résultats sont présentés dans le tableau suivant :
<table>
<tr><th rowspan="2">Target</th><th rowspan="2">Concentration</th><th colspan="2">Intra-assay</th><th colspan="2">Inter-assay</th></tr>
<tr><th>Mean Ct ± SD[a]</th><th>CV (%)</th><th>Mean Ct ± SD</th><th>CV (%)</th></tr>
<tr><td rowspan="3">Elsinoë fawcettii</td><td>1000× LOD[b]</td><td>18.79 ± 0.19</td><td>0.99</td><td>18.93 ± 0.21</td><td>1.11</td></tr>
<tr><td>100× LOD</td><td>22.05 ± 0.11</td><td>0.49</td><td>22.24 ± 0.24</td><td>1.08</td></tr>
<tr><td>10× LOD</td><td>25.38 ± 0.25</td><td>1.00</td><td>26.00 ± 0.14</td><td>0.55</td></tr>
</table></td></tr>
</table>

© Anses – 14, rue Pierre et Marie Curie - 94701 Maisons-Alfort Cedex

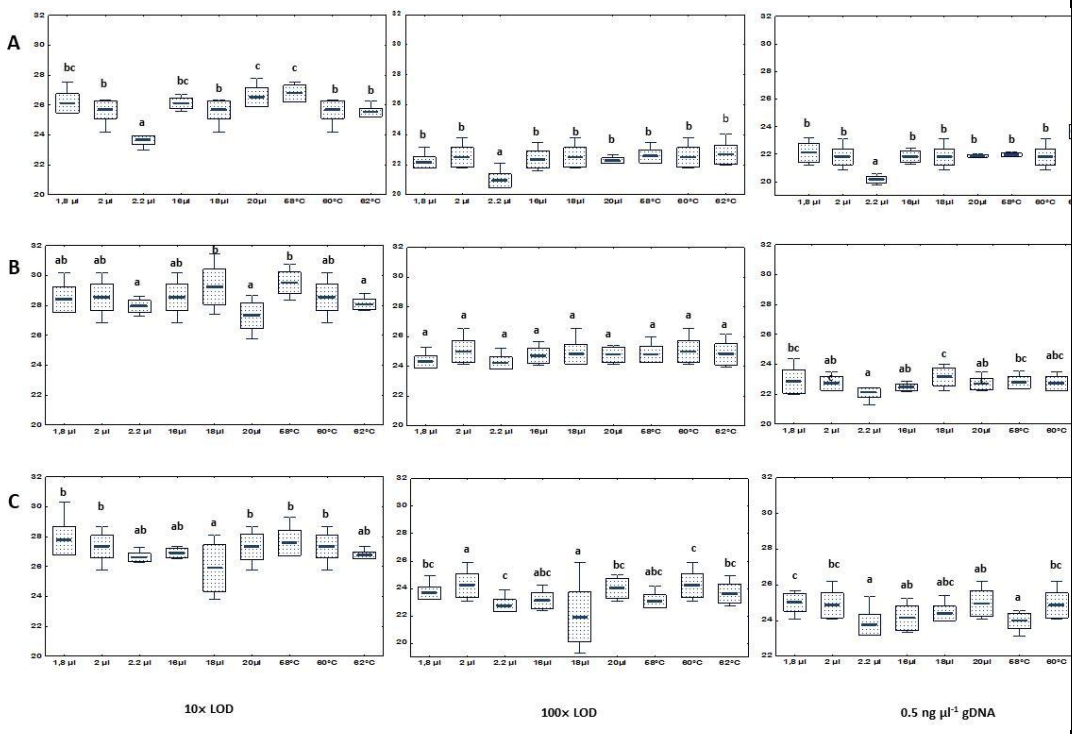
		0.1 ng µL^{-1} gDNA	21.42 ± 0.25	1.19	21.50 ± 0.34	1.60
	E. australis	1000× LOD	19.58 ± 0.29	1.50	20.81 ± 0.54	2.60
		100× LOD	22.66 ± 0.22	0.96	24.53 ± 0.30	1.23
		10× LOD	25.60 ± 0.45	1.74	28.10 ± 0.77	2.76
		0.1 ng µL^{-1} gDNA	20.94 ± 0.25	1.18	22.70 ± 0.90	3.96
	Pseudocercospora angolensis	1000× LOD	19.23 ± 0.20	1.05	19.60 ± 0.25	1.26
		100× LOD	22.57 ± 0.11	0.49	23.20 ± 0.34	1.47
		10× LOD	26.00 ± 0.18	0.68	27.10 ± 0.67	2.47
		0.1 ng µL^{-1} gDNA	23.38 ± 0.21	0.89	24.10 ± 0.37	1.55

La répétabilité et la reproductibilité qualitatives sont toutes les deux à 100% et les coefficients de variation sont tous inférieurs à 10% pour les trois tests espèces-spécifiques.

Les trois tests espèces-spécifiques sont donc répétables et reproductibles., en format multiplex.

Robustesse

La robustesse a été évaluée d'une part en faisant varier le volume d'extrait d'ADN, le volume réactionnel de ± 10% et d'autre part en faisant varier la température d'hybridation/synthèse de ± 2°C, en testant 10 réplicats d'une solution plasmidique cible dosée à 2 concentrations proches de la LOD et 10 réplicats d'ADN extrait d'une culture fongique cible pour chacun des trois parasites. Les tableaux ci-dessous présentent les résultats de robustesse obtenus :



A : *Elsinoë fawcettii*

© Anses – 14, rue Pierre et Marie Curie - 94701 Maisons-

	B : *Elsinoë australis* C : *Pseudocercospora angolensis* [a] Les valeurs de Ct moyen avec la même lettre ne sont pas significativement différentes selon le test de Tukey. Malgré des différences statistiques sur la valeur moyenne de Ct observées pour la variation du volume réactionnel, du volume d'extrait d'ADN et de la température d'hybridation, les résultats qualitatifs (détection des ADN cibles) restent inchangés pour chacun des trois tests espèces-spécifiques. Dans nos conditions, les trois tests espèces-spécifiques sont robustes, utilisés en multiplex.
Sensibilité relative **Spécificité relative** **Exactitude relative**	Ces critères ont été évalués de façon expérimentale par le laboratoire. La comparaison de cette méthode PCR en temps réel avec la méthode par isolement mycologique a été effectuée avec un panel de 104 échantillons potentiellement naturellement contaminés par l'une ou l'autre des trois cibles. Les proportions de résultats positifs et négatifs obtenus par ces deux techniques ont été comparées par un test de Khi2. Au final, cette étude a démontré : - Une meilleure sensibilité relative de la méthode PCR en temps réel (Ahmed et al., 2019). - Une spécificité relative non significativement différente entre les deux techniques.
Autres critères *Multiplexage*	L'utilisation des tests dans un format quadruplex (3 cibles + contrôle d'extraction) a été comparée à leur utilisation respective en format cible monoplex. Les sensibilités analytiques des trois tests en quadruplex étaient non significativement différentes de celles obtenue lors d'une utilisation en monoplex.
Autres critères *Durée d'analyse*	Durée de la méthode PCR en temps réel: environ une journée
Autres critères *Contrôle de la qualité d'un extrait d'ADN*	Afin de valider la qualité d'un extrait d'ADN, une valeur maximale acceptable de Ct a été établie pour le test 18S uni (test de contrôle de la qualité de l'ADN extrait). Ce seuil a été déterminé à 15,84 sur une série de 90 valeurs de Ct. Ces valeurs ont été obtenues à partir de 30 prélèvements sur différentes espèces de Citrus sur un appareil Rotorgene 6500 (Corbett Research).

© Anses – 14, rue Pierre et Marie Curie - 94701 Maisons-Alfort Cedex

Annexe 1

Symptômes de *Elsinoë fawcettii*

Citrus reticulata Temple (Floride)

Citrus limon (Australie)

Citrus limon (Australie)

Citrus reticulata subsp. *unshiu* (Australie)

© Anses – 14, rue Pierre et Marie Curie - 94701 Maisons-

Symptômes de *Elsinoë australis*

Citrus reticulata subsp. *Unshiu* (Argentine)

Symptômes de *Pseudocercospora angolensis*

Citrus sinensis (Cameroun)

Citrus paradisi (Cameroun)

(Photos : ANSES- LSV- Unité de Mycologie)

© Anses – 14, rue Pierre et Marie Curie - 94701 Maisons-Alfort Cedex

Bibliographie

Ahmed Y., Hubert J., Fourrier-Jeandel C., Dewdney M., Aguayo J., Ioos R, 2019. A Set of Conventional and Multiplex Real-Time PCR Assays for Direct Detection of *Elsinoë fawcettii*, *E. australis* and *Pseudocercospora angolensis* in Citrus Fruits. Plant Disease 10.1094/PDIS-05-18-0798-RE.

de Andrade, C.C.L., da Silva, A.S., de Andrade Ogata, L., Dalbosco, M., Pires, L.M., Silva-Junior, G.J., Barreto, R.W., & Pereira, C.M. (2026). Elsinoë citricola is prevalent in rangpur lime scab in Brazil and also occurs on Tahiti lime. *European Journal of Plant Pathology*, doi:10.1007/s10658-026-03228-z.

Directive 2000/29/CE (2000) Council Directive 2000/29/EC of 8 May 2000 on protective measures against the introduction into the Community of organisms harmful to plants or plant products and against their spread within the Community. O.J.L 169, 10.7.2000, 1.

EFSA PLH Panel (EFSA Panel on Plant Health), Jeger, M., Bragard, C., Caffier, D., Candresse, T., Chatzivassiliou, E., Dehnen-Schmutz, K., Gilioli, G., Gregoire, J. C., Anton, J., Miret, J., MacLeod, A., Navarro, M. N., Niere, B., Parnell, S., Potting, R., Rafoss, T., Urek, G., Bruggen, A. V., Werf, W. V. d., West, J., Winter, S., Gonzalez-Dominguez, E., Vicent, A., Vloutoglou, I., Bottex, B., and Rossi, V. 2017b. Pest categorisation of *Pseudocercospora angolensis*. EFSA Journal 15:4883.

Fan, X.L., Barreto, R.W., Groenewald, J.Z., Bezerra, J.D.P., Pereira, O.L., Cheewangkoon, R., Mostert, L., Tian, C.M., & Crous, P.W., 2017. Phylogeny and taxonomy of the scab and spot anthracnose fungus Elsinoë (Myriangiales, Dothideomycetes). Stud. Mycol., 87, 1-41, doi:https://doi.org/10.1016/j.simyco.2017.02.001.

Ioos R, Fourrier C, Iancu G, Gordon TR, 2009. Sensitive Detection of *Fusarium circinatum* in Pine Seed by Combining an Enrichment Procedure with a Real-Time Polymerase Chain Reaction Using Dual-Labeled Probe Chemistry. Phytopathology 99, 582-90.

Pretorius, M. C., Crous, P. W., Groenewald, J. Z., and Braun, U. 2003. Phylogeny of some cercosporoid fungi from citrus. Sydowia 55:286-305.

Timmer, L. W., Priest, M., Broadbent, P., and Tan, M. K. 1996. Morphological and pathological characterization of species of *Elsinoe* causing scab diseases of citrus. Phytopathology 86:1032.

© Anses – 14, rue Pierre et Marie Curie - 94701 Maisons-