

LNPV

Laboratoire
National de la
Protection des
Végétaux

Végétal : Plantes herbacées

Détection du

Tobacco Ringspot Nepovirus
(TRSV)

par technique sérologique ELISA

Réf.:VH1/06/01 version a

Laboratoire de référence :

**LNPV - Unité de virologie des
plantes herbacées**
Domaine Saint Maurice - BP 94
84143 MONTFAVET CEDEX
tél: **04 32 72 28 70**

Sommaire

<u>AVERTISSEMENTS ET PRECAUTIONS DE SECURITE</u>	3
0. <u>INTRODUCTION</u>	3
1. <u>OBJET</u>	3
2. <u>DOMAINE D'APPLICATION</u>	4
3. <u>MATERIEL</u>	4
4. <u>REACTIFS SEROLOGIQUES</u>	4
4.1. CHOIX DES REACTIFS SEROLOGIQUES	4
4.2. CONSERVATION.....	4
5. <u>PRODUITS ET CONSOMMABLES</u>	4
5.1. TAMPONS D'EXTRACTION.....	4
5.2. AUTRES TAMPONS.....	4
5.3. PLAQUES DE MICROTITRATION	4
6. <u>MODE OPERATOIRE</u>	5
6.1. PREPARATION DES ECHANTILLONS.....	5
6.1.1. <i>Echantillons pour laboratoire</i>	5
6.1.2. <i>Echantillons pour analyse</i>	5
6.1.3. <i>Echantillons de référence</i>	5
6.1.4. <i>Broyage des échantillons</i>	6
6.2. MISE EN ŒUVRE DES ANALYSES.....	6
6.2.1. <i>Plan de plaque</i>	6
6.2.2. <i>Dépôts des anticorps et anticorps conjugués</i>	6
6.2.3. <i>Lavages</i>	6
6.2.4. <i>Dépôt des échantillons</i>	6
6.2.5. <i>Dépôt du substrat</i>	7
6.3. LECTURE DES PLAQUES DE MICROTITRATION.....	7
6.4. VALIDATION ET INTERPRETATION DES RESULTATS.....	7
7. <u>FORMULATION DU RESULTAT D'ANALYSE</u>	8
8. <u>SOURCES BIBLIOGRAPHIQUES</u>	8
9. <u>ANNEXES</u>	8
ANNEXE 1 : PLANTES TESTEES AU LNPV DE MONTFAVET	9
ANNEXE 2 : COMPOSITION DES TAMPONS	10
ANNEXE 3 : PLAN DE PLAQUE	11

VEGETAL : PLANTES HERBACEES
DETECTION DU TOBACCO RINGSPOT NEPOVIRUS
(TRSV) SUR FEUILLES
PAR LA TECHNIQUE SEROLOGIQUE ELISA

Avertissements et précautions de sécurité

Les virus phytopathogènes ne présentent pas un caractère de pouvoir pathogène pour l'homme, les précautions à prendre lors de leur manipulation pourront se limiter au respect des consignes générales de protection, dont l'application doit permettre d'éviter la dissémination d'agents pathogènes dans l'environnement .

Ainsi, comme toute autre manipulation d'organismes phytopathogènes, on veillera à inactiver les virus présents dans les végétaux, supports de culture, effluents liquides, par une procédure appropriée (destruction chimique ou chaleur) avant tout rejet dans l'environnement.

Lors de la manipulation de produits chimiques (en particulier le p-nitrophényl phosphate), l'utilisateur veillera à respecter les précautions de sécurité liées à leur classe de risques.

0. Introduction

Cette méthode est directement liée à la Directive Générale : Techniques qualitatives immuno-enzymatiques de type ELISA : DAS et dérivés (référence : DG1/98/A) qui est disponible au laboratoire de référence. Ces deux documents sont complémentaires. La méthode ne peut être appliquée qu'en respectant la directive générale.

1. Objet

La présente méthode permet de détecter le Tobacco ringspot népovirus (TRSV) sur feuilles de plantes herbacées.

Ce virus fait l'objet de dispositions réglementaires :

- Directive 2000/29/ce modifiée, annexe I A1, chapitre D, point 3.
- Arrêté du 22 novembre 2002, modifié, paru au J.O 6/12/2002, dernière modification le 29/11/05, publié au J.O du 30/11/05.

Cette méthode doit être mise en œuvre dans le cadre de l'application des textes ci-dessous référencés.

2. Domaine d'application

La méthode s'applique à des échantillons de plantes herbacées pouvant être infectées par le Tobacco ringspot virus (TRSV). Ce virus est très polyphage, on le trouve notamment sur de nombreuses plantes maraîchères et ornementales.

Se référer à la liste des plantes herbacées testées au laboratoire (cf annexe 1)

3. Matériel

Se conformer aux préconisations de la directive générale (cf DG1/98/a-&3-2). Il est conseillé de disposer d'une pompe à vide pour aspirer les broyats après incubation.

Un broyeur à billes est conseillé pour la préparation des échantillons.

4. Réactifs sérologiques

4.1. Choix des réactifs sérologiques

Utiliser des réactifs spécifiques (cf. DG1/98/a-& 3-3.)

Un conseil pour le choix du fournisseur de réactifs sérologiques peut être apporté par le laboratoire de référence ; il est recommandé de contacter ce laboratoire avant chaque campagne d'analyse. L'exigence minimale sera de ne pas utiliser un réactif testé puis déclaré non satisfaisant par le laboratoire de référence.

4.2. Conservation

Suivre les consignes des fournisseurs de réactifs.

5. Produits et consommables

5.1. Tampons d'extraction

Se référer à l'annexe 2, pour la composition du tampon d'extraction.

5.2. Autres tampons

Se référer au fournisseur de réactifs, à défaut, voir l'annexe 2.

5.3. Plaques de microtitration

Utiliser des plaques de microtitration à fond plat, de type NUNC Immunosorbent Maxisorp, ou tout autre marque assurant une qualité de réaction équivalente ou supérieure.

6. Mode opératoire

6.1. Préparation des échantillons

6.1.1. *Echantillons pour laboratoire*

L'échantillon pour laboratoire est constitué d'une plante ou d'une partie de plante. A l'arrivée au laboratoire, un code est donné à chaque échantillon.

Les résultats de l'analyse seront d'autant plus fiables que le matériel végétal sera propre et en état de conservation.

Il est recommandé de conserver les échantillons au réfrigérateur et, pour éviter leur déshydratation, de les envelopper dans du papier journal sec, le tout mis dans un sac plastique.

6.1.2. *Echantillons pour analyse*

Les prélèvements se feront dans les feuilles, de préférence porteuses de symptômes, et provenant de jeunes pousses.

Chez certaines plantes herbacées, le Tobacco ringspot népovirus, se manifeste par des taches foliaires chlorotiques, quelquefois en anneaux, en arabesques, et pouvant se limiter à une simple chlorose apicale.

La prise d'analyse est constituée d'au moins une fraction de 0.5g de végétal.

Plusieurs prélèvements sont conseillés dans le cas de symptômes douteux ou en l'absence de symptômes.

Les échantillons peuvent être conservés quelques jours au réfrigérateur à + 5°C (+/- 4°C)

Si une conservation plus longue est nécessaire, il est conseillé de conserver le matériel végétal au congélateur, ou si possible dans l'azote liquide qui donne les meilleurs résultats.

6.1.3. *Echantillons de référence*

Les caractéristiques des références infectées (TM) et non infectées (TS) doivent être conformes aux impératifs fixés par la directive générale (cf. DG 1/98/a-& 3-5.)

Dans la mesure du possible, les TS doivent être de la même espèce que celle testée. A défaut, utiliser des TS de la même famille botanique.

Il est nécessaire d'intégrer sur chaque plaque au minimum (cf. annexe 2) :

- Une référence infectée (TM). Mais il est préférable de disposer de deux témoins malades.
- Deux références non infectées (TS), issues de deux échantillons différents (quatre puits au total). Mais, il est préférable d'utiliser trois témoins sains.
- Au moins deux puits de référence tampon d'extraction (Tp).

6.1.4. *Broyage des échantillons*

Broyer le matériel végétal dans le tampon d'extraction (cf. annexe 2), au ratio poids / volume de 1g/9ml, ou selon les indications du fournisseur de réactifs sérologiques, à l'aide d'un broyeur à billes ou de toute autre méthode de broyage permettant d'obtenir des résultats équivalents (mortier, broyeur à rouleau ...).

Après broyage, le matériel végétal doit être conservé au réfrigérateur et utilisé le plus rapidement possible. L'attente entre le broyage et le dépôt ne devra pas dépasser six heures.

Les extraits sont ensuite congelés, et gardés dans l'attente d'un résultat définitif. Décongelés, ils peuvent servir à une éventuelle confirmation.

Ne pas recongeler les échantillons après décongélation.

6.2. Mise en œuvre des analyses

6.2.1. *Plan de plaque*

Se référer aux exigences de la directive générale (DG 1/98/a-& 3.5.3.1 et & 3.5.1). Le plan de plaque conseillé est à consulter dans l'annexe 3.

Le volume des différents dépôts est généralement de 100 µl.

6.2.2. *Dépôts des anticorps et anticorps conjugués*

Les étapes seront suivies selon le mode opératoire du fournisseur. A défaut, se référer aux exigences de la directive générale (DG 1/98/a- paragraphe 3.5.3.2).

Diluer les anticorps dans du tampon de coating (cf. annexe 2), en suivant le rapport de dilution préconisé par le fournisseur.

Incuber à 37°C (\pm 4°C) pendant 2 à 4 heures, sauf mention contraire du fournisseur.

6.2.3. *Lavages*

Après les étapes d'incubation des différents anticorps et des antigènes, des lavages sont obligatoires. Suivre les conseils de la directive générale (DG1/98/a- paragraphe 3.5.3.4).

Dans le cas de lavages manuels, il est conseillé d'en réaliser 3 de 3 minutes chacun. Après incubation des antigènes, il est conseillé d'aspirer les broyats à l'aide d'une pompe à vide, et de réaliser rapidement les lavages.

6.2.4. *Dépôt des échantillons*

Pour chaque échantillon, déposer 2 puits (cf. annexe 2) ; dans le cas où l'on utilise 2 TM, on dépose un puits de chaque TM. Sauf mention contraire du fournisseur, incuber 15 heures minimum à + 5°C (\pm 4°C).

6.2.5. Dépôt du substrat

Diluer le substrat dans du tampon de substrat (cf. annexe 1, en suivant le rapport de dilution préconisé par le fournisseur). Incuber à température ambiante jusqu'à la fin des lectures, sauf mention contraire du fournisseur.

La solution substrat est déposée aussi dans les puits 1 B à 1G inclus, et sert de référence pour la lecture des DO.

6.3. Lecture des plaques de microtitration

Se référer à la directive générale (cf. DG 1/98/a- paragraphe 3.5.4.1). On mesurera les DO au moins deux fois : une première fois à une heure et une deuxième fois à 2 heures. Le zéro optique sera effectué sur les puits de la première colonne contenant uniquement le substrat (cf. annexe 2).

La lecture de référence utilisée pour calculer les seuils sera celle effectuée à 2 heures.

6.4. Validation et interprétation des résultats

Pour valider chaque plaque, se référer à la directive générale (cf. DG 1/98/a-paragraphe 3.5.4.1).

Ainsi, une plaque est validée si aucune anomalie n'est constatée (exemple : bruit de fond anormalement élevé, TM trop faible).

Pour interpréter les lectures, se référer à la directive générale (cf. DG 1/98/a-paragraphe 3.5.4.3.) et aux préconisations du fournisseur des réactifs.

A défaut de ces préconisations, des seuils sont calculés.

Les valeurs de D.O corrigées (D.O brute – D.O moyenne des puits substrats) sont exploitées suivant la lecture de référence effectuée, 2 heures après l'addition du substrat.

A partir de la moyenne de D.O corrigées des témoins sains, deux seuils sont calculés :

Seuil S1 = 2 fois la moyenne des D.O corrigées des témoins sains.

Seuil S2 = 3 fois la moyenne des D.O corrigées des témoins sains.

- Un échantillon dont la valeur de D.O corrigée moyenne des témoins sains est supérieure à S2, est considéré **positif**.

- Un échantillon dont la valeur de D.O corrigée moyenne des témoins sains est inférieure à S1 est considéré **négatif**.

- Un échantillon dont la valeur de D.O corrigée moyenne des témoins sains est inférieure ou égale à 0.100 est considéré **négatif**.

- Un échantillon dont la valeur de D.O corrigée moyenne est comprise entre S2 et S1, est considéré **indéterminé** et devra être soumis à une autre analyse. En cas de résultat indéterminé, il est fortement recommandé de procéder à une nouvelle analyse à partir de nouveaux prélèvements, éventuellement avec d'autres réactifs, si besoin dans un autre laboratoire, de préférence le laboratoire de référence.

7. Formulation du résultat d'analyse

Les résultats doivent être mentionnés selon la directive générale (cf. DG1/98/a-paragraph 3.6.1.) de la manière suivante :

Echantillon positif : Tobacco ringspot nepovirus (TRSV) détecté dans l'échantillon analysé selon la technique ELISA.

Echantillon négatif : Tobacco ringspot nepovirus (TRSV) non détecté dans l'échantillon analysé selon la technique ELISA.

Echantillon de statut non déterminé : résultat indéterminé dans les conditions de l'analyse effectuée selon la technique ELISA.

8. Sources bibliographiques

CLARK MF., ADAMS AN., 1977. Characteristics of the microplate method of enzyme-linked immunosorbent assay for the detection of plant viruses. J.Gen. Virol., 34 :475-483.

ALBOUY J., PONTIER J C., 1980. Adaptation de la méthode immunoenzymatique à la détection des viroses du pélagonium. Ann. Phytopathol., 12 (1) : 71-75.

EOPP, 2000. Protocoles de diagnostic pour les organismes réglementés, Tobacco ringspot népovirus.
PM 7 (2) 1 : 4-8

EOPP/ CABI, 1996. Tobacco ringspot nepovirus.Quarantine Pests For Europe, 2nd edn, pp. 1357-1362.

BRUNT AA., CRABTREE K., DALLWITZ MJ., BRUNT AA., WATSON L., 1996. Tobacco ringspot nepovirus. Virology of Plants., 75 : 1267-1270.

INTERNATIONAL COMMITTEE ON TAXONOMY OF VIRUSES., 2000. Genus nepovirus. Virus Taxonomy, seventh report, pp697-701.

HAMDOLLAHZADEH A., FOSTER GD., 2001. Cloning and sequencing of the coat protein gene of Tobacco ringspot virus isolates from UK and Iran. Acta Virologica., 45 : 319-326.

9. Annexes

Annexe 1 : Plantes testées au LNPV de Montfavet

Annexe 2 : Composition des tampons

Annexe 3 : Plan de plaque

Annexe 1

Plantes testées au LNPV de Montfavet

Noms Français	Noms Latins	Famille Botanique
Anémone	Anemone spp	Ranunculacée
Amaryllis	Eucharis Candida	Amaryllidacée
Artichaut	Cynara Scolymus	Ranunculacée
Cerisier	Cerasus spp	Rosacée
Chénopode	Chenopodium Quinoa	Chenopodiacee
Fraisier	Fragaria spp	Rosacée
Framboisier	Rubus spp	Rosacée
Haricot	Phaseolus Vulgaris	Légumineuse
Laitue	Lactuca Sativa	Composée
Lys	Lilium spp	Liliacée
Melon	Cucumis Melo	Curcubitacée
Pêcher	Persica spp	Rosacée
Pélargonium	Pelargonium spp	Géraniacée
Pétunia	Petunia Hybrida	Solanacée
Phlox	Phlox spp	Polémoniacée
Pomme de Terre	Solanum Tuberosum	Solanacée
Poivron	Capsicum Annuum	Solanacée
Tabac	Nicotiana Tabacum	Solanacée
Tomate	Lycopersicum Esculentum	Solanacée
Tulipe	Tulipa spp	Liliacée

Annexe 2

Composition des tampons

1. Tampon PBS (NaCl 137mM, KH₂PO₄ 1,8mM, Na₂HPO₄ 8,1mM, KCl 2,7mM, pH 7,4)

NaCl : 8 g
KH₂PO₄ : 0,24 g
Na₂HPO₄ · 12 H₂O : 2,9 g
KCl : 0,2 g
Eau distillée ou osmosée stérile : qsp 1 l
Ajuster le pH à 7,4 ± 0,2

2. Tampon de rinçage (PBS + 0,05% Tween 20)

Tween 20 : 0,5 ml
PBS : 50 ml
Eau distillée ou osmosée stérile : qsp 1 l

3. Tampon de coating (Na₂CO₃ 15mM, NaHCO₃ 35mM, pH 9,6)

Na₂CO₃ : 1,59 g
NaHCO₃ : 2,93 g
Eau distillée ou osmosée stérile : qsp 1 l
Ajuster le pH à 9,6 ± 0,2

4. Tampon d'extraction (PBS + 0,05% Tween 20 + 2% PVP K25)

Polyvinylpyrrolidone (PVP) K 25 : 20 g
Tween 20 : 0,5 ml
PBS : qsp 1 l

5. Tampon conjugué (PBS + 0,05% Tween 20 + 2% PVP K25 + 0,2% Ovalbumine)

PVP K 25: 20 g
Ovalbumine (ou éventuellement BSA) : 2 g
Tween 20 : 0,5 ml
PBS : qsp 1 l

6. Tampon de substrat (Diéthanolamine 10%, pH 9,8)

Diéthanolamine : 97 ml
Eau distillée ou osmosée stérile : qsp 1 l
Ajuster le pH à 9,8 ± 0,2

Les erreurs maximales tolérées pour la mesure des volumes et des masses seront de 5 %.

Annexe 3

Plan de plaque conseillé

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	eau	eau	eau	eau	eau	eau	eau	eau	eau	eau	eau	eau
B	Eau ou substrat	Tp	2	5	8	TS2	12	15	18	21	23	eau
C	Eau ou substrat	Tp	2	5	8	TS2	12	15	18	21	23	eau
D	Eau ou substrat	TS1	3	6	9	Tp	13	16	19	22	24	eau
E	Eau ou substrat	TS1	3	6	9	Tp	13	16	19	22	24	eau
F	Eau ou substrat	1	4	7	10	11	14	17	20	TS3	TM1	eau
G	Eau ou substrat	1	4	7	10	11	14	17	20	TS3	TM2	eau
H	eau	eau	eau	eau	eau	eau	eau	eau	eau	eau	eau	eau

TS1, TS2, TS3 = témoins sains (éventuellement TS2 = TS3)

TM1, TM2 = témoins malades (éventuellement TM1 = TM2)

Tp = témoin tampon extraction

1 à 24 = échantillons pour laboratoire

A chaque étape, remplir les lignes A et H et la colonne 12 d'eau distillée, osmosée ou permutée.

Les puits 1B à 1G inclus seront remplis d'eau distillée, osmosée ou permutée à toutes les étapes sauf la dernière où l'on déposera du substrat.