

Méthode d'analyse en santé des végétaux

RÉFÉRENCE : ANSES/LSV/MA 056 - Version 2

Septembre 2018

Détection du virus de la rhizomanie de la betterave, Beet necrotic yellow vein virus (BNYVV) par la technique sérologique ELISA

Laboratoire de la Santé des Végétaux

Laboratoire national de référence « Autres virus » : Virus sur toutes matrices autres que bananier et plantes tropicales, virus de la Sharka (PPV), virus de la pomme de terre et virus sur agrumes



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
VH/05/09/ version a		Mars 2005	Version initiale
MOA 011 partie B version 1a*	mineure	Décembre 2010	Mise en forme de la méthode et modification du préambule selon un schéma harmonisé commun à l'ensemble des nouvelles méthodes ; Retrait des définitions de ce document pour les intégrer dans un glossaire général ;
MOA 011 partie B version 1b	Mineure	Mai 2015	Ajout d'une étape de saturation à la BSA (1% de BSA dans du tampon PBS-Tween) après la phase de coating (250µL par puits pendant 1h à 37°C)
MOA056 v2	Mineure	Juin 2018	<ul style="list-style-type: none">- Mise au format ANSES- Reformulation de l'étape de broyage en enlevant « selon la préconisation du fournisseur » et en précisant au ratio 1/10ème (soit 0,5 g de végétal pour 4,5 mL de tampon de broyage ou 0,02g de végétal lyophilisé pour 5 mL)- Rajout de la possibilité d'utiliser le tampon de broyage recommandé par le LNR- Rajout de la possibilité d'utiliser 200µL pour le dépôt des extraits. Ajout d'un paragraphe d'introduction

* La version 1a a fait l'objet d'une consultation de juillet à septembre 2010, notamment auprès des laboratoires agréés français.

**La version 2 a fait l'objet d'une consultation du 12/04/2018 au 29/04/2018 sur le site internet de l'agence, notamment auprès des laboratoires agréés français.



Avant-propos

La présente méthode a été développée par :

Anses - Laboratoire de la santé des végétaux – Unité de Bactériologie, Virologie, OGM

Laboratoire National de Référence « Autres virus » : Virus sur toutes matrices autres que bananier et plantes tropicales, virus de la Sharka (PPV), virus de la pomme de terre et virus sur agrumes.

Adresse :

7 rue Jean Dixméras

49044 ANGERS Cedex 01

France

Tèl. : +33(0)2.41.20.74.20

Contact : angers.lsv@anses.fr

La présente méthode a été initialement développée par le Laboratoire National de la Protection des Végétaux de Montfavet (84) en 2005 puis réécrite et modifiée par l'unité de Bactériologie, virologie, OGM du laboratoire de la santé des végétaux de l'ANSES (49).

La présente méthode est une version actualisée et modifiée de la MOA 011 partie B version 1b.



Sommaire

Avant-propos	3
Introduction	6
Avertissements et précautions de sécurité	7
1. Objet et domaine d'application	8
2. Documents de référence	8
3. Termes, sigles et définitions	8
4. Principe de la méthode	8
5. Réactifs	10
5.1 Eau.....	10
5.2 Réactifs sérologiques	10
5.3 Tampons	10
5.4 Autres réactifs et consommables.....	11
5.5 Contrôles.....	11
6. Appareillage et matériels	12
6.1 Broyeur.....	13
6.2 Spectrophotomètre	13
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.....	14
8. Mode opératoire	14
8.1 Préparation des échantillons pour analyse	14
8.2 Préparation des échantillons de feuilles.....	15
8.3 Plan de plaque	15
8.4 Broyage.....	15
8.5 Déroulement du test	16
8.5.1 Coating (Immunoglobulines IgG).....	16
8.5.2 Lavages	16
8.5.3 Etape de saturation à la BSA (Bovine Sérum Albumine)	16
8.5.4 Dépôt des broyats.....	16



8.5.5 Lavages	17
8.5.6 Dépôt du deuxième anticorps (uniquement TAS-ELISA)	17
8.5.7 Conjugué (Immunoglobulines couplées à l'enzyme IgG-E)	17
8.5.8 Dépôt du Substrat	17
8.5.9 Lecture.....	17
9. Résultats	18
9.1 Contrôle de la validité des résultats	18
9.2 Calculs et expression des résultats	18
9.2.1 Calcul des seuils	18
9.2.2 Interprétation.....	18
10. Caractéristiques de performance de la méthode.....	19
Annexe 1	20
Annexe 2.....	21
Bibliographie.....	22



Introduction

Le *Beet necrotic yellow vein virus* (BNYVV) a été identifié comme le virus responsable de la maladie de la rhizomanie de la betterave sucrière dans les années 1970. Ce nom a été attribué en référence à l'un des symptômes racinaires de la maladie, qui consiste en une prolifération du chevelu racinaire.

Les plantes hôtes de ce virus appartiennent principalement à la famille des Chenopodiaceae et à l'espèce *Beta vulgaris* (betteraves fourragère, potagère et sucrière ainsi que la poirée) mais aussi à l'espèce *Spinacia oleracea* (épinard).

Ce virus est transmis à la betterave par les zoospores d'un Plasmodiophoride du sol : *Polymyxa betae* (Protiste, parasite obligatoire des racines).

Le BNYVV appartient au genre *Benyvirus* dont il est l'espèce type. C'est un virus constitué de 4 à 5 ARN simple brin positif de différentes tailles (6,7 ; 4,6 ; 1,8 ; 1,4 et 1,3 kb). Ces ARN sont encapsidés dans des particules non enveloppées en forme de bâtonnets de 60 nm à 390 nm de long et de 20nm de diamètre.

Il existe actuellement 4 souches majoritaires non distinctes sérologiquement. Deux souches majeures dénommées types A et B qui possèdent 4 ARNss et deux souches mineures identifiées ultérieurement : le type P (Pithiviers - Européen) et le type J (Japon - Asiatique) qui sont les seules à contenir l'ARN 5 (Pour revue : Hleibieh et al., 2007). Ces dernières ont été identifiées au Japon, en France (secteur de Pithiviers), au Kazakhstan et en Angleterre (Ratti et al., 2004). Ces deux types provoquent des symptômes plus sévères et une baisse de rendement importante (Harju et al. 2004).



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 exécutés par du personnel ayant reçu une formation appropriée.



1. Objet et domaine d'application

Cette méthode sérologique ELISA (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay) s'applique à la détection en routine, dans les racines ou feuilles de betteraves, d'épinards ou autres plantes hôtes du virus de la rhizomanie de la betterave : le Beet necrotic yellow vein virus (BNYVV).

Elle doit être utilisée en respectant les recommandations de la méthode générale MOA 008 «Techniques ELISA en bactériologie / virologie» dans sa version en vigueur.

2. Documents de référence

- [1] MOA 008 : Techniques ELISA Bactériologie /Virologie qui fixe les principes généraux de réalisation des analyses de dépistage ou d'identification des organismes nuisibles pour les végétaux à l'aide de la technique ELISA.
- [2] GLO 001- Glossaire des termes techniques en vigueur au LSV.
- [3] Rapport de projet méthodologique (2015) Evaluation des méthodes de détection du Beet necrotic yellow vein virus (BNYVV).
- [4] Rapport de caractérisation et de validation de méthode d'analyse (2015) : Détection du Beet necrotic yellow vein virus (BNYVV) par ELISA - Optimisation de la méthode de détection ELISA. Rapport interne LSV-UBVO-ANSES.

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.

4. Principe de la méthode

La technique sérologique ELISA repose sur réaction de reconnaissance antigène – anticorps révélée à l'aide d'une réaction enzymatique de dégradation colorée d'un substrat. L'intensité de cette coloration est mesurée par spectrophotométrie via l'absorbance du milieu réactionnel (DO = densité optique). Cette absorbance est d'autant plus élevée que la concentration en hydrolysate du substrat est importante.



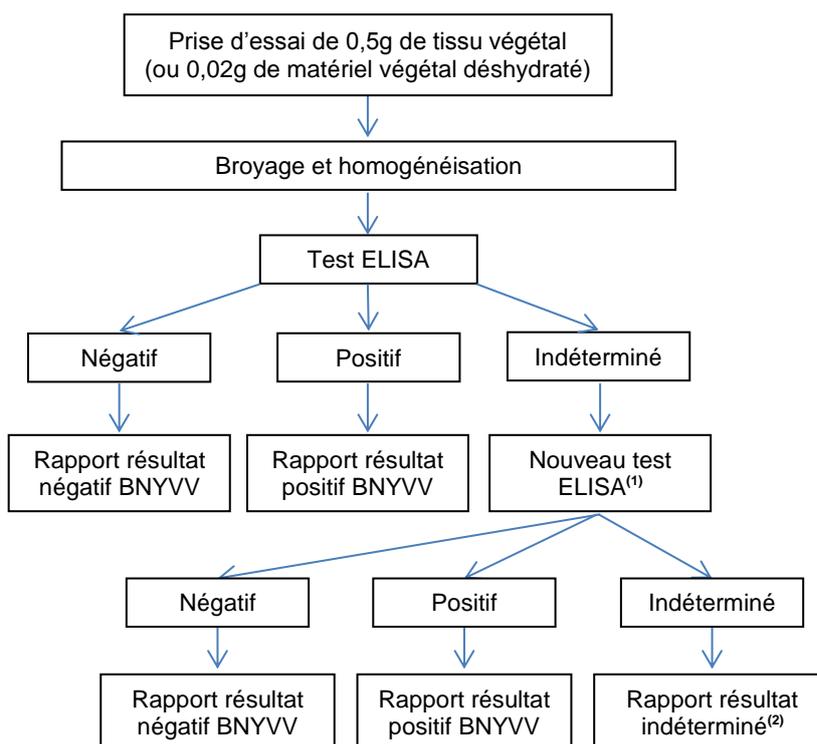
Bien que produisant une valeur chiffrée (absorbance), il s'agit d'une méthode qualitative donnant une réponse présence / absence de l'organisme cible recherché. Dans certains cas, une réponse indéterminée peut être obtenue.

Les échantillons pour lesquels une réponse négative est obtenue sont considérés comme indemnes de la maladie ou contaminés à un niveau trop faible pour être mis en évidence par la méthode. Les échantillons pour lesquels une réponse positive est obtenue sont considérés comme contaminés.

Tout résultat indéterminé pourra être confirmé soit par le renouvellement du test avec un même sérum et/ou un sérum d'un autre fournisseur soit par une méthode reposant sur un autre principe technique. Par ailleurs, pour diverses raisons liées principalement à la spécificité de situations phytosanitaires régionales, le demandeur d'analyse peut également être amené à demander la confirmation d'un résultat positif ou d'un résultat négatif.

L'analyse de confirmation est réalisée à partir du broyat végétal ou à défaut du reliquat de prise d'essai (matériel végétal reçu au laboratoire).

Le schéma de la méthode est présenté ci-dessous :



(1) Nouveau test ELISA effectué avec le même sérum et/ou un sérum d'un autre fournisseur afin de statuer sur un résultat indéterminé. Ce nouveau test est effectué par le laboratoire agréé ayant effectué l'analyse.

(2) Analyse de confirmation (réalisée par le LNR) qui pourra être effectuée sur le broyat végétal réalisé (s'il est correctement conservé et en quantité suffisante) ou à défaut sur le reliquat de matériel végétal.



5. Réactifs

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

En règle générale, le manipulateur doit veiller (par l'utilisation de produits et consommables certifiés, nettoyage, stérilisation ou tout autre traitement approprié) à l'absence dans l'eau, produits et consommables utilisés, de contaminations ou de tout autre élément pouvant impacter le résultat.

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

5.1 Eau

L'eau doit être de qualité « analytique » (i.e. déminéralisée, distillée, osmosée,...) garantissant d'atteindre les critères de performance attendus pour les tests.

5.2 Réactifs sérologiques

Le laboratoire utilisera des réactifs sérologiques spécifiques du BNYVV. La présente méthode a été caractérisée et validée initialement avec les réactifs de marque LOEWE (Sauerlach, D) (référence 2015: lot N°41511003). D'autres réactifs peuvent être utilisés à condition que leurs performances soient au moins égales à celles des réactifs utilisés pour la validation (cf. § 10 – Caractéristiques de performance de la méthode).

Un conseil pour le choix du fournisseur de réactifs sérologiques peut être apporté par le laboratoire de référence en cas de besoin;

Les réactifs sérologiques sont des réactifs critiques pour les analyses ELISA. Ils doivent faire l'objet de contrôles avant (ou parallèlement à) leur première utilisation conformément aux préconisations de la MOA 008.

5.3 Tampons

Composition et préparation

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

- Tampon de lavage PBS-Tween;
- Tampon de coating;
- Tampon de saturation à la BSA;
- Tampon de broyage (ou d'extraction); le tampon PBS-Tween + PVP est recommandé;
- Tampon de conjugué;
- Tampon de substrat.

Les solutions et tampons utilisés doivent être de préférence ceux recommandés par le fournisseur de réactifs sérologiques.

Le laboratoire peut aussi utiliser certains tampons communs à d'autres méthodes ELISA : le tampon de lavage et le tampon de substrat. Par contre, le tampon conjugué et le tampon de coating doivent être ceux recommandés par le fournisseur de réactifs sérologiques.



Le tampon d'extraction doit être de préférence celui recommandé par le laboratoire de référence (Annexe 2) ou à défaut celui recommandé par le fournisseur du réactif sérologique.

Le laboratoire peut aussi fabriquer certains tampons ou certaines solutions.

Conservation

Les préparations de tampon et solutions et leur durée et conditions de conservation doivent en tout point être conformes aux recommandations du fournisseur ou du laboratoire de référence.

Pour les tampons préparés au laboratoire :

- les solutions 1X : 1 mois à +5°C, sauf indication contraire ;
- les solutions 1X avec azide de sodium (dilution d'un tampon commercial concentré) : 3 mois à +5°C ;
- les solutions stock concentrées : au maximum 6 mois à température ambiante.

Certains tampons (tampons de blocage, certains tampons de broyage) doivent être préparés extemporanément, dans ce cas, il est conseillé d'utiliser le tampon au maximum dans les 2 jours.

5.4 Autres réactifs et consommables

- **Plaques de microtitration** (et couvercles): Utiliser des plaques de microtitration à fond plat de type NUNC Immunosorbent Maxisorp certifiées ou de toute autre marque assurant une qualité de réaction au moins équivalente.
- **Substrat**: à diluer dans du tampon de substrat selon les consignes du fournisseur. Pour un marquage à la phosphatase alcaline (le plus fréquent), le substrat est le p-Nitrophényl Phosphate (pNPP) ou équivalent.
- **Produit détergent désinfectant adapté**: Hypochlorite de sodium à 1% de chlore actif (m/v) (ou autre produit équivalent) pour la désinfection des surfaces de travail et du matériel.

5.5 Contrôles

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

- Témoins sains (TS)

Analyses sur végétal : de façon générale, il convient d'utiliser des témoins sains de même nature que les matrices à analyser. Pour les analyses sur racines, il s'agit de références "racines de betteraves non infectées" ou de toutes autres racines saines de la même espèce que les échantillons traités. Il est préférable que la forme d'utilisation soit identique à celle de l'échantillon : fraîche, congelée ou lyophilisée. Les témoins sains sont traités en parallèle et selon les mêmes conditions que les échantillons de racines de betterave à analyser. Ils sont au minimum trois et issus, dans la mesure du possible, de broyats différents.

La variété de racines de betteraves saines servant de témoins sains (ou de tout autre espèce) doit être dans la mesure du possible, la plus proche des échantillons traités. En effet, des absorbances très différentes peuvent être obtenues selon les variétés utilisées.

Si possible, traiter les témoins sains avant les témoins malades. Ces témoins sains serviront à déterminer le seuil de positivité.

Remarque : Pour les échantillons de racines obtenues dans le cadre de tests biologiques (MOA 011 partie A version 1a), les témoins sains correspondent aux racines de betteraves ayant poussé sur milieu témoin sain (terreau stérile ou terreau stérile en mélange avec du sable). Ils sont au nombre de 3 (3 pots). Ils sont préparés de façon identique aux échantillons à analyser.



- **Témoins malades (TM)**

Analyses sur végétal : ils donnent au minimum l'assurance d'un déroulement correct de la manipulation. Pour chaque série d'analyses, on peut soit utiliser des végétaux identifiés contaminés et préparés au laboratoire (échantillon de référence naturellement contaminé ou souche multipliée par indexage) ou des témoins commerciaux lyophilisés à préparer selon les recommandations du fournisseur.

En complément d'un témoin malade (TM) à concentration virale élevée, il est conseillé d'utiliser un TMc présentant des valeurs d'absorbances (ou densités optiques (D.O.)) "calibrées" et situées nettement en dessous des valeurs de saturation lors de la lecture de référence. Ainsi, on pourra détecter de petites anomalies de déroulement du test, susceptibles d'entraîner la non détection d'échantillons faiblement infectés. Le laboratoire de référence peut délivrer des conseils pour constituer de tels TMc.

Remarque : Pour les échantillons de racines obtenues dans le cadre de tests biologiques (MOA 011 partie A version 1a), les témoins malades correspondent aux racines de betterave ayant poussé sur milieu témoin réputé contaminé et préparées comme les échantillons à tester. Ils sont au nombre de 2 (2 pots). Un seul pot peut être utilisé.

- **Témoins tampons (TP)**

Il s'agit d'un essai blanc constitué uniquement du tampon de broyage pour le contrôle du bruit de fond sur le tampon de broyage et vérifier que celui-ci est indemne de toute contamination susceptible de modifier les résultats d'analyse.

- **Témoins substrat** (appelés également puits substrat).

Il s'agit d'un contrôle du bruit de fond généré par le substrat seul. Chaque puits est rempli d'eau de qualité analytique à chaque étape de dépôt, excepté à la dernière étape où ils sont remplis de la solution de substrat. La première colonne des plaques de microtitration peut être utilisée.

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

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.

Pour la mise en œuvre de cette méthode, le laboratoire disposera des appareils décrits dans la MOA 008.

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



Grandeur	EMT
Volume	Volume < 10 mL : EMT = $\pm 10\%$ Volume ≥ 10 mL : EMT = $\pm 5\%$
Masse	EMT = $\pm 10\%$
pH	EMT = $\pm 0,3$ unité pH
Température	Incubateur : EMT = $\pm 3^{\circ}\text{C}$ Réfrigérateur : 5°C et EMT = $\pm 4^{\circ}\text{C}$ Congélateur : $\leq -18^{\circ}\text{C}$
Temps	EMT = $\pm 10\%$

6.1 Broyeur

La méthode a été caractérisée et validée en utilisant un broyeur à bille (type Homex 6 de Bioreba), le broyage de l'échantillon se faisant dans un sachet de broyage en plastique, muni d'une gaze de filtration à mailles en nylon. Le broyat peut alors être récupéré directement dans le sachet. Toutefois, tout autre procédé de broyage permettant d'obtenir des résultats équivalents peut également être utilisé.

6.2 Spectrophotomètre

La méthode a été caractérisée et validée sur un spectrophotomètre de type Multiskan GO de chez Thermo Scientific. Tout autre spectrophotomètre adapté techniquement et métrologiquement à la lecture de microplaques ELISA peut être utilisé à la condition de vérifier régulièrement sa conformité métrologique en termes de justesse, de répétabilité et de linéarité.

7. Échantillons

7.1 Conditions d'acceptation des échantillons

Les échantillons reçus pour analyse doivent être dans un bon état de conservation, c'est-à-dire, ni desséchés, ni nécrosés ni en cours de décomposition. Dans le cas contraire, le laboratoire émet des réserves à réception en précisant la raison. Si les échantillons arrivent dans un état trop dégradé, le laboratoire peut refuser l'analyse. Le refus d'analyse doit être motivé et doit être notifié au client dans les plus brefs délais.

Pour les échantillons déshydratés (échantillons lyophilisés ou déshydratés), ils doivent être complètement déshydratés (sans développement de moisissures et conditionnés dans un conditionnement étanche à l'air).

7.2 Conservation des échantillons avant analyse

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



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

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

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, jusqu'à au moins le dixième jour ouvrable suivant l'envoi au demandeur d'un rapport d'analyse concluant à la non mise en évidence de l'organisme recherché. Ce délai imposé est destiné à laisser le temps au demandeur de l'analyse de contester le résultat auprès du laboratoire (ce qui prolonge la conservation du reliquat jusqu'à l'issue de la contestation) et éventuellement de demander une analyse contradictoire.

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

8. Mode opératoire

L'utilisateur opérera selon une procédure adaptée à son contexte (infrastructures, organisation) qui vise à éviter tout risque de confusion entre échantillons ou de contamination d'un échantillon par un autre. Entre chaque prise d'essai, l'utilisateur veillera à désinfecter le matériel utilisé pour les prélèvements.

8.1 Préparation des échantillons pour analyse

Un échantillon est constitué d'un prélèvement de 15 ou 30 plantes entières (zone protégée), disposant d'un appareil racinaire le plus préservé possible.

Après avoir lavé et nettoyé les plantes, les répartir en sous-échantillons de 3 plantes chacun (soit 5 ou 10 sous-échantillons suivant le nombre de plantes prélevées). Prélever sur chacun des sous-échantillons des radicelles, ou à défaut de l'épiderme de la racine, afin de préparer 2 fractions de 0,5 g par sous-échantillon constituant les deux prises d'essai, en respectant la meilleure homogénéité possible entre les fractions.

Une fois préparée, la première fraction de prélèvement de radicelles doit être traitée le jour même. La deuxième fraction sera conservée par toute méthode n'altérant pas les propriétés sérologiques du virus (cf. 7.2), pour permettre de faire effectuer, si nécessaire, une analyse de contrôle ou de confirmation des résultats par le laboratoire de référence.



Remarque : Pour les racines obtenues dans le cadre de tests biologiques (MOA 011 partie A version 1a), l'échantillon pour analyse est constitué de plantules ayant servi au piégeage et dont l'appareil racinaire a été lavé. Dans ce cas, chaque échantillon est constitué de 5 sous échantillons (correspondant à 5 pots de culture parmi les 6). Le prélèvement s'effectue sur tige + racinelles avec pesée de $0,5g \pm 0,1g$ par sous échantillon.

Si la pesée de chaque sous échantillon n'atteint pas 0,5g (minimum 0,2g), le ratio poids/tampon de broyage sera adapté. S'il reste du matériel végétal, celui-ci sera conservé soit à $5^{\circ}C \pm 4^{\circ}C$ si une deuxième analyse dans les 48h suivant le dépotage est nécessaire, soit à $<-15^{\circ}C$ (pour une conservation maximale de 6 mois).

8.2 Préparation des échantillons de feuilles

Pour le matériel frais, chaque prise d'essai est constituée de 0,5g de matériel végétal frais. Pour le matériel déshydraté (échantillons lyophilisés ou déshydratés), la prise d'essai est constituée de 0,02g de matériel végétal déshydraté ou lyophilisé.

Remarque : Si l'échantillon est constitué de plusieurs feuilles, ou si l'échantillon est constitué d'un plant entier, il convient de faire la prise d'essai en groupant plusieurs feuilles de façon à obtenir au moins 0,5g.

8.3 Plan de plaque

- Les puits de bordure ne sont pas utilisés (phénomènes aléatoires observés modifiant l'absorbance). Ils sont remplis d'eau permutée ou distillée ou osmosée lors du dépôt d'anticorps, du dépôt des broyats et du dépôt du conjugué.
- Établir soigneusement le plan de distribution (plan de plaque) et d'identification des extraits à l'intérieur de la plaque. Chaque échantillon est répété au moins 1 fois soit 2 puits par échantillon.
- Les témoins sains (TS), au nombre de 3, sont répartis uniformément sur la plaque. (2 puits/TS)
- Chaque échantillon est déposé dans deux puits adjacents.
- Les témoins positifs, 1 au minimum, sont déposés sur deux puits. Le deuxième puits peut être rempli d'une dilution du premier.
- Deux puits au minimum sont réservés au témoin tampon de broyage.

8.4 Broyage

Broyer le matériel végétal au $1/10^{\text{ème}}$ (généralement : 0,5g de matériel végétal frais pour 4,5mL de tampon ou 0,02g de matériel végétal lyophilisé pour 5mL de tampon) dans le tampon de broyage préconisé par le LNR ou par le 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.

La séquence de broyage doit se terminer par le broyage des témoins malades.

Les broyats obtenus doivent être conservés au réfrigérateur et utilisés le plus rapidement possible (au plus tard dans la journée). Après dépôt, les extraits sont congelés et conservés à une température inférieure ou égale à $-18^{\circ}C$ dans l'attente d'un résultat définitif. Ils pourront servir à une éventuelle confirmation.



8.5 Déroulement du test

Établir soigneusement le plan de distribution (plan de plaque) et d'identification des extraits (voir exemple en annexe 1). Chaque échantillon (prise d'analyse) est au moins répété 1 fois soit 2 puits par échantillon.

Quel que soit le fournisseur, une étape de saturation avec de la BSA (Bovine sérum albumine) doit être effectuée après la phase de coating afin de limiter le bruit de fond.

Elle permet de bloquer les sites inoccupés de la microplaque par un agent bloquant (ici, BSA) afin de limiter le bruit de fond en prévenant la fixation non spécifique des antigènes (Ag) et du conjugué (IgG-E).

Attention: Pour les étapes de coating, lavages, incubations, dépôts des extraits, dépôt du 2^{ème} anticorps (suivant antiserum), dépôts du conjugué et substrat suivre en priorité le protocole d'analyse du fournisseur de réactifs (durées d'incubation, volumes, dilutions).

En absence de consigne précise du fournisseur de réactifs, et dans le cas d'un DAS-ELISA ou d'un TAS-ELISA, les consignes décrites dans les paragraphes **8.5.1** à **8.5.9** peuvent être appliquées.

8.5.1 Coating (Immunoglobulines **IgG**)

- Les IgG sont diluées (par exemple au 1/200ème ou 1/1000ème) dans du tampon coating puis homogénéisées au moment de l'emploi.
- Suivant le plan de plaque, déposer par puit 200µL (ou 100µL) de solution.
- Recouvrir la plaque d'un couvercle et mettre éventuellement la plaque en chambre humide.
- Incuber à + 37°C, pour une durée de 2h à 4h.

8.5.2 Lavages

Les lavages peuvent être effectués à l'aide d'un laveur de plaques ou manuellement de la manière suivante :

- Vider vigoureusement les plaques,
- Procéder ensuite à 3 rinçages de 3 min avec du tampon lavage,
- Lors du dernier rinçage, éliminer le restant en tapant les plaques sur du papier absorbant. Ne pas laisser sécher la plaque.

8.5.3 Etape de saturation à la BSA (Bovine Sérum Albumine)

- Déposer 250µL par puit de tampon PBS-Tween à 1% de BSA (qualité biologie moléculaire, pureté ≥ 98% ou qualité supérieure). Incuber une heure à +37°C.
- Procéder à un lavage comme indiqué dans le § 8.5.2

Remarque : Ce tampon ne se conserve que 2 jours au réfrigérateur.

8.5.4 Dépôt des broyats

Remarque : Pendant le dépôt des broyats, il est préférable d'égoutter une plaque et de laisser les autres en attente dans du tampon de lavage.

- Suivant le plan de plaque, déposer par puit 200µL (ou 100µL) de broyat de plante.
- Recouvrir la plaque d'un couvercle et mettre éventuellement la plaque en chambre humide.
- Incuber au réfrigérateur à +5°C pendant une nuit ou à 37°C pendant 4h.



8.5.5 Lavages

- Aspirer chaque puit un par un ou les vider énergiquement en évitant de contaminer les puits entre eux. Effectuer au minimum un premier lavage rapide suivi de 3 lavages effectués comme indiqué au §8.5.2.

8.5.6 Dépôt du deuxième anticorps (uniquement TAS-ELISA)

- Procéder comme pour l'étape de coating décrite ci-dessus puis procéder à un lavage comme indiqué dans le § 8.5.2

8.5.7 Conjugué (Immunoglobulines couplées à l'enzyme IgG-E)

- Les IgG-E sont diluées (par exemple 1/200ème ou 1/1000ème) dans du tampon conjugué puis homogénéisées au moment de l'emploi.
- Suivant le plan de plaque, déposer par puit 200µL (ou 100µL) de solution.
- Recouvrir la plaque d'un couvercle et mettre éventuellement la plaque en chambre humide.
- Incuber à + 37°C, pour une durée comprise entre 2h et 4h.
- Procéder à un lavage comme indiqué dans le § 8.5.2

8.5.8 Dépôt du Substrat

- Pour un marquage à la phosphatase alcaline (le plus fréquent), le substrat, p-Nitrophényl Phosphate est mis en solution dans du tampon substrat selon le ratio 1mg/mL.
- Suivant le plan de plaque, déposer par puit 200µL (ou 100µL) de solution.
- Agiter la plaque éventuellement sur agitateur spécifique.
- Recouvrir la plaque d'un couvercle et mettre éventuellement la plaque en chambre humide ainsi qu'à l'obscurité.
- Incuber à température ambiante.

8.5.9 Lecture

Pour le marqueur phosphatase alcaline et le p-Nitrophényl Phosphate comme substrat, la lecture se fait à une longueur d'ondes de 405 nm. Plusieurs lectures peuvent être réalisées à des temps différents afin d'évaluer la cinétique enzymatique.

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

La lecture de référence utilisée pour calculer les seuils doit être celle effectuée à 2h, sauf prescription contraire du fournisseur ou du LNR.

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

Toutes ces étapes simples doivent être menées avec soin, constance et rigueur, notamment les opérations de lavage.



9. Résultats

9.1 Contrôle de la validité des résultats

L'observation et conformité à l'attendu des résultats obtenus sur les témoins décrits au §5.5 sont un préalable à l'interprétation des résultats obtenus sur les échantillons soumis à analyse.

Les résultats ne sont interprétables qu'à partir du moment où tous les critères de validation des plaques présentés dans la méthode d'analyse officielle MOA 008 sont vérifiés.

9.2 Calculs et expression des résultats

L'utilisation des seuils définis ci-après est obligatoire.

9.2.1 Calcul des seuils

Les densités optiques utilisées pour calculer les différents seuils sont les densités optiques brutes de lecture obtenues à l'aide du spectrophotomètre (TS : témoin sain ; MTS : moyenne de l'absorbance des puits des témoins sains).

- Seuil 1

Deux modes de calcul sont proposés pour déterminer la valeur du seuil 1. La valeur retenue parmi les 2 modes de calcul (1 et 1bis) sera celle qui correspond à la **valeur calculée la plus élevée**.

- Mode de calcul 1 = $MTS + (3 \times \text{écart type des D.O. brutes des TS})$
- Mode de calcul 1bis = $MTS \times 1,1$

- Seuil 2

Seuil S2 = $MTS \times 2$

9.2.2 Interprétation

La combinaison des deux seuils permet de définir 3 zones :

- Négatif : \leq à Seuil S1

Le résultat peut être formulé de la façon suivante : **virus de la rhizomanie non détecté dans l'échantillon analysé,**

- Indéterminé : $>$ à Seuil S1 et $<$ à Seuil S2

Le résultat peut être formulé de la façon suivante : **Résultat sérologique indéterminé selon les limites de la méthode de détection utilisée.**

- Positif : \geq à Seuil S2

Le résultat peut être formulé de la façon suivante : **virus de la rhizomanie détecté dans l'échantillon analysé.**

Pour les échantillons pour lesquels un résultat indéterminé est obtenu, une nouvelle analyse selon la même méthode sur les parties de l'échantillon conservées soit au congélateur, soit lyophilisées, sera réalisée à l'aide du même antiserum ou d'un second antiserum.

Le cas échéant, l'échantillon pourra faire l'objet d'une analyse de confirmation par le laboratoire national de référence. Cette analyse de confirmation sera réalisée à partir du broyat végétal ou à défaut du reliquat de prise d'essai (matériel végétal reçu au laboratoire).



10. Caractéristiques de performance de la méthode

Les caractéristiques de performance de la méthode ont été évaluées en deux rapports successifs (cf. §2 : documents de référence 3 et 4). Les valeurs données ci-dessous correspondent aux valeurs obtenues lors du dernier essai simplifié de validation (Document de référence n°4). Les valeurs données ci-dessous ont été obtenues avec le sérum de chez LOEWE (N° de lot 41511003)

Caractéristique	Paramètre	Valeur ou résultat obtenu lors de la caractérisation	Principales informations relatives aux modalités de réalisation de la caractérisation
Sensibilité	Pourcentage d'échantillons détectés parmi les échantillons cibles	100%	<p>Les 6 échantillons cibles testés :</p> <ul style="list-style-type: none"> - 14/356 : Racines lyophilisées de betterave - LNPV139 : Feuilles lyophilisées de Chenopodium quinoa - LNPV150 : Feuilles lyophilisées de Nicotiana benthamiana - LNPV149 : Feuilles lyophilisées de Nicotiana benthamiana - 13/445-3 : Racines lyophilisées de betteraves Jamon - LNPV121 : Lyophilisat de broyat - LNPV8 : Racines lyophilisées de betterave <p>Les échantillons ont été testés à raison de deux puits par réplicat sur deux réplicats.</p>
Spécificité	Pourcentage d'échantillons non détectés parmi les échantillons non-cibles	100%	<p>Les 5 échantillons non cibles testés :</p> <ul style="list-style-type: none"> - Racines congelées d'épinard - Racines congelées de Poirée - Racines congelées de betteraves cv Ariana - Racines congelées de betteraves cv Détroit - Racines congelées de betteraves cv Jamon <p>Les échantillons ont été testés à raison de deux puits par réplicat sur deux réplicats.</p>
Exactitude	Pourcentage de vrais positifs et de vrais négatifs parmi des échantillons cibles et non-cibles	100%	L'exactitude a été calculée à l'aide de l'ensemble des résultats obtenus lors de l'évaluation de la sensibilité et de la spécificité.
Seuil de détection	Niveau de dilution le plus faible pour lequel 100% des résultats sont positifs	Dilution 1.10^{-2}	1 gamme de dilutions décimales a été constituée à partir d'un échantillon LNPV150 de feuilles de Nicotiana benthamiana indexées avec du BNYVV et lyophilisées. Chaque niveau de dilution a été testé à raison de deux puits par réplicat sur 6 réplicats.



Annexe 1

Un exemple de plan de plaque pour la réalisation du test sérologique de détection du BNYVV est présenté ci-dessous :

Plan de plaque n°												
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A												
B	Substrat	TS1									TS3	
C	Substrat	TS1									TS3	
D	Substrat				TS2	Tp					Tp	
E	Substrat				TS2	Tp					Tp	
F	Substrat									Tp	TM	
G	Substrat									Tp	TM	
H												

TS1, TS2, TS3 = puits témoin sain issu de trois séries identiques

Tp = puits tampon de broyage seul

TM = puits témoin malade

Les puits grisés sont remplis uniquement avec de l'eau distillée.

Les puits substrats sont remplis avec de l'eau pour toutes les étapes sauf la dernière où le substrat seul est apporté.



Annexe 2

Préparation du tampon de broyage PBS-Tween +PVP

Recette pour 1 litre de PBS-Tween + PVP :

PVP K25 ou PVP K40 : 20g
PBS-Tween 10X : 100mL
Eau déminéralisée : 900mL

Conservation 1 mois au réfrigérateur

PBS-Tween 10X :

Sodium chloride (NaCl) : 80,0 g
Monobasic potassium phosphate (KH_2PO_4) : 2,0 g
Dibasic sodium phosphate (Na_2HPO_4) : 11,5 g
Potassium chloride (KCl) : 2,0 g
Azide de sodium (NaN_3) : 2,0 g
Tween 20 : 5 mL
Qsp : 1 litre d'eau déminéralisée

pH : 7,4 (ajuster le pH à l'aide de NaCl ou HCl selon besoin)

Conservation 6 mois à température ambiante



Bibliographie

1. Anonymous (2006). "Beet necrotic yellow vein virus (benyvirus)." EPPO bulletin 36(3): 429-440.
2. Clark, M. F., & Adams, A. N. (1977). Characteristics of the microplate method of enzyme-linked immunosorbent assay for the detection of plant viruses. *Journal of general virology*, 34(3), 475-483.
3. Harju, V. A., et al. (2005). "The use of real-time RT-PCR (TaqMan®) and post-ELISA virus release for the detection of Beet necrotic yellow vein virus types containing RNA 5 and its comparison with conventional RT-PCR." *journal of Virological Methods* 123(1): 73-80.
4. Hleibieh, K., et al. (2007). "Étiologie de la rhizomanie de la betterave sucrière." *Virologie* 11(6): 409-421.
5. Ratti, C., et al. (2005). "A multiplex RT-PCR assay capable of distinguishing beet necrotic yellow vein virus types A and B." *journal of Virological Methods* 124(1–2): 41-47.