

LNPV

Laboratoire

National de la

Protection des

Végétaux

Végétal :

Pelargonium spp.

détection du

Tomato ringspot nepovirus (ToRSV)

par technique sérologique ELISA

Réf.: Méthode VH / 06 / 13 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

E-mail : lnpv@avignon.inra.fr

VÉGÉTAL : PELARGONIUM SPP, DÉTECTION DU TOMATO RINGSPOT NEPOVIRUS (ToRSV) SUR FEUILLES PAR LA TECHNIQUE SEROLOGIQUE ELISA

Avertissements et précautions de sécurité

Les virus phytopathogènes ne présentant 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 phytopathogènes dans l'environnement.

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

Lors de la manipulation des produits chimiques (en particulier l'azide de sodium et le p-nitrophenyl phosphate), l'utilisateur veillera à respecter les précautions de sécurité liées à leur classe de risque.

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 *Tomato ringspot nepovirus* (ToRSV), virus provoquant sur *Pélargonium* des taches chlorotiques, le plus souvent en anneaux.

Ce virus fait l'objet de dispositions réglementaires :

- au niveau européen dans la directive 2000/29/CE, annexe IAI : Introduction et dissémination interdites dans tous les Etats membres.
- au niveau français, dans l'arrêté du 31 juillet 2000, paru au J.O. du 31 août 2000, annexe AI: lutte obligatoire de façon permanente sur tout le territoire.

Cette méthode est à utiliser pour les analyses dans le cadre des contrôles phytosanitaires pour les parasites de quarantaine en surveillance du territoire et à l'importation.

2. Domaine d'application

La méthode s'applique uniquement aux feuilles de *Pélargonium*.

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 - §1).

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 1, pour la composition du tampon d'extraction.

5.2. Autres tampons

Se référer au fournisseur de réactifs. A défaut, voir l'annexe 1.

5.3. Plaques de microtitration

Utiliser des plaques de microtitration à fond plat, de type NUNC immunosorbent Maxisorp, ou de toute 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 correct 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 situées dans les parties médianes ou basales de la plante. La prise d'analyse est constituée d'au moins une fraction de 0,5 g de végétal.

Dans le cas de jeunes plantes, on rencontre souvent de discrètes lésions chlorotiques. Sur plantes plus âgées, ces lésions se présentent quelquefois sous forme d'anneaux chlorotiques.

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

Les échantillons peuvent être conservés quelques jours au réfrigérateur à +5°C (\pm 4°C). Si une conservation plus longue est nécessaire, il est conseillé de conserver le matériel végétal dans l'azote liquide.

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. DG1/98/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 (4 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 1) au ratio poids / volume de 1 g / 9 ml, 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 rouleaux...).

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 6 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 (DG1/98/a - §3.5.3.1 et §3.5.1). Le plan de plaque conseillé est à consulter dans l'annexe 2.

Le volume des différents dépôts est généralement de 100 μ l.

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 (DG1/98/a - §3.5.3.2).

Diluer les anticorps dans du tampon de coating (Cf. annexe 1), en suivant le rapport de dilution préconisé par le fournisseur.

Incuber à 37°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 - §3.5.3.4).

Dans le cas de lavages manuels, il est conseillé d'en réaliser trois de 3 minutes chacun.

Après l'incubation des antigènes, il est conseillé d'aspirer les broyats à l'aide d'une pompe à vide, puis de rincer la plaque rapidement avec du tampon de lavage, avant d'effectuer 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 ($\pm 4^\circ\text{C}$).

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 1B à 1G inclus, et sert de référence pour la lecture des D.O.

6.3. Lecture des plaques de microtitration

Se référer à la directive générale (Cf. DG1/98/a - §3.5.4.1). On mesurera les D.O. au moins deux fois : une première fois une heure et une deuxième fois deux heures après l'addition du substrat. 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. DG1/98/a - §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. DG1/98/a - §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 substrat) sont exploitées suivant la lecture de référence effectuée deux heures après l'addition du substrat.

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

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

Seuil S2 = 3 fois la moyenne des D.O corrigés 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 **douteux** et devra être soumis à une autre analyse.

En cas de résultat douteux, 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 - §3.6.1) de la manière suivante :

→ Echantillon positif : *Tomato ringspot nepovirus* (ToRSV) détecté dans l'échantillon analysé selon la technique ELISA.

→ Echantillon négatif : *Tomato ringspot nepovirus* (ToRSV) 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 JC., 1980. Adaptation de la méthode immunoenzymatique à la détection des viroses du pélagonium. Ann. Phytopathol., 12 (1) : 71-75.

SUSAN R., NEWHART C. PETER ROMAINE., RICHARD CRAIG., J. AMER., 1982 Enzyme-linked Immunosorbent Assay for the Detection of Tobacco ringspot virus in Pelargonium x hortorum. Soc. Hort. Sci., 107 (5) : 930-933.

9. Annexes

Annexe 1 : Composition des tampons

Annexe 2 : Plan de plaque

Annexe 1

Composition des tampons

1 - Tampon PBS (NaCl 137 mM, KH₂ PO₄ 1,8 mM,
Na₂HPO₄ 8,1 mM, KCl 2,7 mM, pH 7,4)

NaCl	8,00 g
KH ₂ PO ₄	0,24 g
Na ₂ HPO ₄ 12H ₂ O	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 + Tween 20 0,05 %)

Tween 20	0,5 ml
PBS	qsp 1 l

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

Na ₂ CO ₃	1,59 g
NaH CO ₃	2,93 g
Eau distillée ou osmosée stérile	qsp 1 l

Ajuster le pH à 9,6 ± 0,2

4. Tampon d'extraction (PVP K25 2%, gélatine 0,1 %, Tween 20 0,05 %, pH 8,6)

Tris 0,1 M	12,1 g
PVP K25	20,0 g
Gélatine	1,0 g
Tween 20	0,5 ml
Eau distillée ou osmosée stérile	qsp 1 l

Ajuster le pH à 8,6 ± 0,2

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

PVP K25	20,0 g
Ovabulmine (ou éventuellement BSA).....	2,0 g
Tween 20.....	0,5 ml
PBS 20X.....	50,0 ml
Eau distillée ou osmosée stérile.....	qsp 1 l

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

Diéthanolamine.....	97,0 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 2

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 TS3 = TS2)

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

Tp = témoin tampon d'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 à la dernière où l'on déposera du substrat.