

LNPV

Laboratoire

National de la

Protection des

Végétaux

Végétal : plantes de tomate

(*Lycopersicon esculentum*),

détection du tomato yellow leaf curl

geminivirus (TYLCV) et autres

gémminivirus sérologiquement reliés

par la technique sérologique ELISA

Réf.: Méthode VH•01/03 a

Laboratoire de référence :

**LNPV Unité de Virologie des plantes
herbacées** à Avignon

Domaine Saint Maurice - BP 94

84143 MONTFAVET CEDEX

fax : 04 32 72 28 72

VEGETAL : PLANTES DE TOMATE (*Lycopersicon esculentum*), DETECTION DU TOMATO YELLOW LEAF CURL GEMINIVIRUS (TYLCV) et autres géminivirus sérologiquement reliés PAR LA TECHNIQUE SEROLOGIQUE ELISA

Avertissements et précautions de sécurité

Les virus ne présentant aucun 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 pour 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 de les rejeter.

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, en analyses de série, sur plants de tomate le Tomato Yellow Leaf Curl geminivirus (TYLCV), virus des feuilles jaunes en cuillère de la tomate, ainsi que d'autres géminivirus de la tomate transmis par *Bemisia tabaci*. Ainsi, elle est à utiliser pour les analyses notamment dans le cadre des contrôles phytosanitaires pour les parasites de quarantaine en surveillance du territoire communautaire et à l'importation de pays tiers.

2. Domaine d'application

La méthode s'applique à des échantillons de plantes et parties de plantes de tomate pouvant être infectés par le TYLCV ou d'autres géminivirus de la tomate transmis par *Bemisia tabaci*.

3. Réactifs, produits et consommables

3.1. Réactifs sérologiques

3.1.1. Choix des réactifs

Utiliser des réactifs spécifiques (cf. § 3.3.1 et 3.3.2 de la Directive générale ELISA).

Un conseil pour le choix du fournisseur de réactifs sérologiques peut être apporté, notamment, par le Laboratoire de référence : il est nécessaire de contacter ce laboratoire avant chaque campagne d'analyse.

En la matière, l'exigence minimale sera de ne pas utiliser un réactif testé par le Laboratoire de référence et déclaré "non valable".

Le laboratoire utilisateur pourra choisir l'un des réactifs testés et déclaré valable par le Laboratoire de référence, ou tout autre réactif non testé : il est dans ce cas vivement conseillé que cet "autre réactif" soit accompagné d'un protocole d'utilisation complet (c'est à dire intégrant le mode de calcul des seuils).

3.1.2. Conservation : suivre les consignes des fournisseurs de réactifs.

3.2. Tampons

Utiliser les tampons indiqués par les fournisseurs de réactifs.

Conservation : suivre les consignes des fournisseurs (en leur absence, conserver 1 mois à $5^{\circ} \pm 4^{\circ}\text{C}$, sauf les tampons d'extraction contenant des antioxydants, qui sont à conserver au maximum 15 jours à $5^{\circ} \pm 4^{\circ}\text{C}$).

3.3. Autre consommable

Plaques de microtitration à fond plat non certifiées, par exemple de type NUNC Immunosorbent Maxisorp, ou toute autre marque assurant une qualité de réaction équivalente ou supérieure.

4. Appareillage

Se conformer aux préconisations du § 3.2. de la Directive générale ELISA.

5. Échantillonnage et échantillons

5.1. Échantillons pour laboratoire

L'échantillon pour laboratoire est constitué de plantes de tomate, de préférence entières, à défaut la partie apicale de la plante. Elles doivent être individualisées lors de l'envoi au laboratoire.

Le matériel végétal doit arriver en bon état, propre, frais et non nécrosé.

Conservation : l'échantillon pour laboratoire peut être conservé 4 à 5 jours au réfrigérateur avant préparation de l'échantillon pour analyse.

5.2. Préparation de l'échantillon pour analyse

Prélever des jeunes feuilles, présentant ou non des symptômes, sur un ou plusieurs apex d'une plante et mélanger. A partir de cet ensemble homogénéisé, prévoir si possible plusieurs fractions de 0,5 g à 1 g par échantillon, dans l'éventualité d'une analyse supplémentaire.

Conservation : ainsi préparé, le matériel végétal peut être traité en frais ou après conservation au maximum de 48 heures au réfrigérateur, 3 mois au congélateur, sous forme de feuilles. D'autres modes de conservation peuvent être envisagés, tels que la

conservation dans de l'azote liquide ou la dessiccation selon la méthode de BOS (dessiccation d'au moins 10 jours, au maximum de 3 mois, au réfrigérateur).

Lorsque le laboratoire est contraint à utiliser du matériel conservé, le rapport d'essai devra mentionner cette particularité :

"Échantillon traité, par obligation technique ou organisationnelle, en non frais, mais après conservation àdurantjours."

Il est conseillé au laboratoire d'indiquer au client les éventuelles conséquences de cette utilisation.

6. Mode opératoire

6.1. Prise d'analyse

La prise d'analyse est constituée de fractions de 0,5 à 1 g du matériel végétal préparé comme indiqué dans § 5.2.

6.2. Essais témoins

Il est nécessaire d'intégrer sur chaque plaque au moins une référence infectée - TM - (2 cupules), trois références non infectées - TS - issues de trois plantes différentes (6 cupules au total) ainsi que quatre cupules de référence tampon d'extraction (Ta).

Dans la mesure du possible, TM et TS doivent être de la (ou des) même(s) espèce(s) que celle(s) testée(s).

6.3. Extraction des antigènes

Broyer le matériel végétal dans le tampon d'extraction, au ratio poids / volume indiqué par le fournisseur de réactifs sérologiques, à l'aide d'un mortier, d'un broyeur à rouleaux ou à roulement à bille, ou de toute autre méthode de broyage permettant d'obtenir des résultats équivalents.

Pour les broyages au mortier ou au broyeur à rouleaux, filtrer l'extrait sur gaze. Récupérer l'extrait filtré en tube et laisser décanter au minimum 30 min au réfrigérateur. Les sacs pour broyage avec roulement à bille contiennent le plus souvent une gaze coton ou synthétique qui dispense de cette filtration après broyage.

L'extrait obtenu doit être remis au réfrigérateur le plus vite possible. La durée de conservation de l'extrait ne doit pas dépasser 48 h au réfrigérateur ou 3 mois au congélateur.

6.4. Détection sérologique

Suivre les protocoles des fournisseurs de réactifs lorsque ces protocoles sont disponibles ou, à défaut, contacter le Laboratoire de référence (cf. § 3.1).

7. Validation et interprétation des résultats

Se référer au § 3.5.4 de la Directive générale ELISA et aux préconisations du fournisseur. A défaut de formulation du mode d'interprétation dans le protocole du fournisseur, s'adresser au Laboratoire de référence qui, s'il a testé le réactif en cause, précisera le système de validation des résultats.

8. Expression des résultats

Se référer au § 3.6. de la Directive générale ELISA et au § 5.2 ci-dessus.

Elimination des déchets

Tout fragment de végétal infecté doit être détruit par autoclavage ou autre moyen. Le matériel de laboratoire ayant été en contact avec le végétal infecté avant broyage doit être désinfecté.

9. Sources bibliographiques

BOS L., 1983. Order out of chaos : Preservation in BOS, 102-104. *In* Introduction to plant virology, 160 p., Pudoc Wageningen, Pays Bas.

CLARK M.F., ADAMS A.N., 1977. Characteristics of the microplate method of enzyme-linked immunosorbent assay for the detection of plant viruses, *J. Gen. Virol.*, **34** : 475-483.

DALMON A., LATERROT H., ALLEX D., MARCHOUX G., 1998. Le TYLCV sur tomate : une méthode de détection en série contre une menace sérieuse. *Culture légumière*, **44** : 31-34.

MACINTOSH S., ROBINSON D.J., HARRISON B.D., 1992. Detection of three whitefly-transmitted geminiviruses occurring in Europe by tests with heterologous monoclonal antibodies, *Ann. appl. biol.*, **121** : 297-303.

THOMAS J.E., MASSALKI P.R., HARRISON B.D., 1986. Production of monoclonal antibodies to African Cassava Mosaic Virus and differences in their reactivity with other whitefly-transmitted geminiviruses, *J. Gen. Virol.*, **67** : 2739-2748.