

LNPV

Laboratoire
National de la
Protection des
Végétaux

Végétaux herbacés,

détection des virus

Tomato Spotted Wilt Virus (TSWV)

et

Impatiens Necrotic Spot Virus (INSV)

par technique sérologique ELISA

Réf.: Méthode VH/04/08 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

Végétaux Herbacés,
Détection des virus *Tomato spotted wilt virus* (TSWV) et
***Impatiens necrotic spot virus* (INSV)**
par la Technique Sérologique ELISA

Sommaire

<u>Avertissements et précautions de sécurité</u>	3
<u>0. Introduction</u>	3
<u>1. Objet</u>	3
<u>2. Domaine d'application</u>	3
<u>3. Matériel</u>	4
<u>4. Réactifs sérologiques</u>	4
4.1 Choix des réactifs	4
4.2 Conservation	4
<u>5. Produits et consommables</u>	4
5.1. Tampons d'extraction	4
5.2. Autres tampons	4
5.3. Plaques de microtitration	4
<u>6. Mode opératoire</u>	4
6.1. Préparation des échantillons	4
6.1.1. Echantillons pour laboratoire	4
6.1.2. Echantillons pour analyse	5
6.1.3. Echantillons de référence	5
6.1.4. Broyage des échantillons	5
6.1.5. Elimination des déchets	5
6.2. Mise en œuvre des analyses	6
6.2.1. Plan de plaque	6
6.2.2. Dépôts des anticorps et anticorps conjugués	6
6.2.3. Lavages	6
6.2.4. Dépôt des antigènes	6
6.2.5. Dépôt du substrat	6
6.3. Lecture des plaques de microtitration	6
6.4. Validation et interprétation des résultats	6
<u>7. Formulation du résultat d'analyse</u>	7
<u>8. Sources bibliographiques</u>	8
<u>9. Annexes</u>	
Annexe 1. Quelques végétaux hôtes du TSWV et de l'INSV	9
Annexe 2. Composition des tampons	10
Annexe 3. Plan de plaque	12

Végétaux Herbacés,
Détection des virus *Tomato spotted wilt virus* (TSWV) et
***Impatiens necrotic spot virus* (INSV)**
par la Technique Sérologique ELISA

Avertissements et précautions de sécurité

Ces virus 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 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 tout rejet dans l'environnement.

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, soit le *Tomato Spotted Wilt Virus* (TSWV) agent de la maladie bronzée de la tomate, soit l'*Impatiens Necrotic Spot Virus* (INSV) agent de la maladie des taches nécrotiques de l'impatiens.

Ces virus font l'objet de dispositions réglementaires :

- au niveau européen dans la directive 2000/29/CE :
 - annexe IB : introduction interdite au Danemark, en Finlande et en Suède,
 - annexe II A II : interdiction sur céleri, piment, melon, chrysanthème, impatiens de Nouvelle Guinée, laitue, tomate, tabac, aubergine et pomme de terre
- au niveau français, dans l'arrêté de lutte obligatoire du 31 juillet 2000, paru au J.O. du 31 août 2000 :
 - annexe B I : lutte obligatoire sous certaines conditions.

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 à des échantillons de plantes herbacées pouvant être infectés par le TSWV et /ou l'INSV. Sauf mention spéciale, les mêmes dispositions sont valables pour ces deux virus recherchés sur les végétaux cités en 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

Se conformer aux préconisations de la directive générale (cf. DG1/98/ a -§ 3.3).

4.1. Choix des réactifs sérologiques

Utiliser des réactifs spécifiques de chacun des deux virus concernés.

Un conseil pour le choix du fournisseur de réactifs sérologiques peut être apporté par le laboratoire de référence qui vérifie leur spécificité : des réactions croisées entre ces deux virus peuvent exister et induire des faux positifs. Il est recommandé de contacter ce laboratoire avant chaque campagne d'analyse.

4.2. Conservation

Suivre les consignes des fournisseurs de réactifs.

5. Produits et consommables

5.1. Tampons d'extraction

Certaines espèces végétales nécessitent l'utilisation de tampons d'extraction spécifiques.
Consulter l'annexe 2.

5.2. Autres tampons

Se référer au fournisseur de réactifs ou voir l'annexe 2.

5.3. Plaques de microtitration

Utiliser des plaques de microtitration à fond plat, de type NUNC Immunosorbent Maxisorp, ou 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 de plantes, de préférence la partie aérienne entière. A défaut, du fait de la répartition hétérogène du virus dans la plante, il convient de prélever à différents niveaux (parties basale, médiane et apicale), en orientant les prélèvements vers des symptômes évoquant une infection par un virus. Chaque échantillon pour laboratoire est repéré par un code.

Le matériel végétal doit arriver au laboratoire en état correct de propreté et de fraîcheur.

Conservation : la durée de conservation de l'échantillon est liée à l'espèce végétale et à son état de fraîcheur. Il est recommandé d'envelopper le matériel végétal dans du papier absorbant sec, puis dans un sachet plastique, et de conserver le tout au réfrigérateur.

6.1.2. Echantillons pour analyse

Prélever des feuilles, et /ou des parties de fruit ou de tige, si possible présentant des symptômes, et mélanger. En l'absence de symptômes, faire des prélèvements de façon aléatoire. A partir de cet ensemble homogénéisé, la prise d'analyse est constituée d'une ou plusieurs fractions de 0,5 g à 1 g. Prévoir si possible des fractions supplémentaires, dans l'éventualité d'une analyse complémentaire.

Conservation : ainsi préparé, le matériel végétal frais doit être utilisé rapidement. Différents modes de conservation peuvent être envisagés : la congélation, la lyophilisation, la conservation dans l'azote liquide, la dessiccation par la méthode de Bos (dessiccation en présence de chlorure de calcium). Ce dernier mode de conservation est pratique dans le cas d'un échantillon qui doit voyager.

La conservation n'est pas sans risque de détruire le virus recherché : elle peut quelquefois induire des résultats faussement négatifs (échantillons contaminés détectés négatifs).

Lorsque le laboratoire est contraint d'utiliser du matériel conservé, le rapport d'analyse doit mentionner cette particularité :

«Echantillon traité après conservation (citer le mode de conservation) durant (citer la durée).»

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 (ou des) même(s) espèce(s) et de la même variété que celle(s) testée(s). Sinon tâcher d'utiliser des TS de la même famille botanique.

Il est nécessaire d'intégrer sur chaque plaque au minimum (cf. annexe 3) :

- une référence infectée (TM) par virus recherché (2 puits par virus).
- trois références non infectées (TS) issues de trois échantillons différents (6 puits au total). Une référence non infectée par famille végétale testée est nécessaire.
- quatre puits de référence tampon d'extraction (Tp). Chaque tampon d'extraction utilisé doit être intégré.

6.1.4. Broyage des échantillons

Broyer le matériel végétal dans le tampon d'extraction (cf. annexe 2) 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...).

L'extrait obtenu doit être conservé au réfrigérateur et utilisé le plus vite possible. Après dépôt, les extraits sont congelés et gardés dans l'attente d'un résultat définitif. Décongelés, ils peuvent servir à une confirmation.

6.1.5. Elimination des déchets

Tout fragment de végétal infecté doit être détruit par autoclavage ou autre moyen inactivant les virus. Le matériel ayant été en contact avec le végétal infecté doit être désinfecté.

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.). Consulter l'annexe 3.

Le volume des différents dépôts est généralement de 100µl.

6.2.2. Dépôts des anticorps et anticorps conjugués

S'il s'agit de méthode DAS-ELISA ou TAS-ELISA 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.).

Utiliser les tampons (annexe 2) et les réactifs selon les dilutions fixées par le fournisseur.

Incuber selon les préconisations du fournisseur (généralement 1 à 4 heures à 37°C ±3°C) et les exigences de la directive générale (DG1/98/ a - § 3.5.3.3.).

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 3 de 3 minutes.

Après l'incubation des antigènes, il est conseillé d'aspirer les broyats à l'aide d'une pompe à vide et de rincer la plaque rapidement avant de réaliser les lavages.

6.2.4. Dépôt des antigènes

Se référer à la directive générale (DG1/98/ a - § 3.5.3.5).

Sauf mention contraire du fournisseur, incuber 15 heures minimum à 5°C ± 4°C ; une incubation de 2 heures à 37°C ± 3°C est également possible.

6.2.5. Dépôt du substrat

Sauf mention contraire du fournisseur, déposer une solution à 1 mg/ml. Consulter la directive générale (DG1/98/ a - §3.5.3.6. et 3.5.4.1.).

La composition du tampon est précisée par le fournisseur ou consulter l'annexe 2.

La solution substrat est déposée aussi dans les puits 1B à 1G inclus.

6.3. Lecture des plaques de microtitration

Les mesures de densité optique (D.O.) sont effectuées à l'aide d'un spectrophotomètre : se référer à la directive générale (cf. DG1/98/ a - § 3.5.4.1.) et aux préconisations du fournisseur de réactifs.

Le zéro optique sera effectué sur les puits de la première colonne contenant uniquement le substrat.

Trois lectures sont conseillées : environ 30 minutes, 1 heure, 2 heures après le dépôt du substrat. La mesure à 2 heures est la lecture de référence utilisée pour calculer les seuils d'interprétation.

6.4. Validation et interprétation des résultats

Pour valider chaque plaque, se référer à la directive générale (cf. DG1/98/ a - § 3.5.4.2.).

Pour interpréter les valeurs de densité optique (D.O.), se référer à la directive générale (cf. DG1/98/a - § 3.5.4.3.), et aux préconisations du fournisseur de 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 après 2 heures d'incubation du substrat.

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

seuil **S1** = 2 fois la moyenne des témoins sains

seuil **S2** = 3 fois la moyenne des témoins sains

- ⇒ Un échantillon dont la valeur de D.O. corrigée moyenne est supérieure à S2, est considéré **positif**
- ⇒ Un échantillon dont la valeur de D.O. corrigée moyenne est inférieure à S1, est considéré **négatif**
- ⇒ Un échantillon dont la valeur de D.O. corrigée moyenne 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

Suivre les précautions citées dans la directive générale (cf DG1/98/a § 3.6.1.).

Les résultats doivent être mentionnés selon la directive générale (cf DG1/98/ a - § 3.6.2.) de la manière suivante :

⇒ si l'échantillon est positif :

Tomato spotted wilt virus (TSWV) et / ou Impatiens necrotic spot virus (INSV) déTECTÉ(S) dans l'échantillon analysé selon la technique ELISA.

⇒ si l'échantillon est négatif :

Tomato spotted wilt virus (TSWV) et/ ou Impatiens necrotic spot virus (INSV) non déTECTÉ(S) dans l'échantillon analysé selon la technique ELISA.

⇒ si l'échantillon est douteux :

Résultat d'analyse douteux dans les conditions de l'analyse pour la recherche de Tomato spotted wilt virus (TSWV) et / ou Impatiens necrotic spot virus (INSV) par la technique ELISA (fournir succinctement une explication et préciser la suite à donner).

8. Sources bibliographiques

ALBOUY J., POUTIER J.C., 1980. Adaptation de la méthode immunoenzymatique à la détection des viroses du pélagonium. *Annales de phytopathologie*, **12** (1), 71-75.

ALLEX D., WINOCQ M.L., CAILLY M., FEINBERG M., HOSTACHY B., 2003. Mise en œuvre d'un test inter-laboratoires pour la détection des tospovirus (TSWV et INSV). Partie 1. Validation d'un mode opératoire officiel. *Phytoma*. Mai 2003.

ALLEX D., WINOCQ M.L., CAILLY M., FEINBERG M., HOSTACHY B., 2003. Mise en œuvre d'un test inter-laboratoires pour la détection des tospovirus (TSWV et INSV). Partie 2. Stratégie d'interprétation des résultats d'analyse. *Phytoma*. Juin 2003.

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.

Annexe 1

Quelques végétaux hôtes du TSWV et de l'INSV

Nom vernaculaire	Nom latin	Famille botanique
aubergine	<i>Solanum melongena</i>	Solanacée
basilic	<i>Ocimum basilicum</i>	Labiacée
bégonia	<i>Begonia spp</i>	Begoniacée
céleri	<i>Apium graveolens</i>	Ombellifère
chrysanthème	<i>Dendranthema spp</i>	Composée
cinéraire	<i>Senecio cruentus</i>	Composée
cyclamen	<i>Cyclamen spp</i>	Primulacée
impatiente de Nouvelle Guinée	<i>Impatiens novae-guinea</i>	Balsaminacée
kalanchoë	<i>Kalanchoe spp</i>	Crassulacée
laitue	<i>Lactuca sativa</i>	Composée
lisianthus	<i>Lisianthus russelianum</i>	Gentianacée
melon	<i>Cucumis melo</i>	Cucurbitacée
pélargonium	<i>Pelargonium spp</i>	Géraniacée
pétunia	<i>Petunia hybrida</i>	Solanacée
piment	<i>Capsicum annum</i>	Solanacée
pomme de terre	<i>Solanum tuberosum</i>	Solanacée
tabac	<i>Nicotiana tabacum</i>	Solanacée
tomate	<i>Lycopersicum esculentum</i>	Solanacée

Annexe 2

Composition des tampons

1. P.B.S. (phosphate buffered saline)

NaCl.....	8 g
KH ₂ PO ₄	0,24 g
Na ₂ HPO ₄ 12H ₂ O.....	2,9 g
KCl.....	0,2g
Eau distillée stérile.....	qsp 1 l
pH 7,4 ± 0,2	

2. Tampon de lavage des plaques

Tween 20.....	0,5 ml
PBS.....	qsp 1 l

3. Tampon d'extraction standard

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

4. Tampon d'extraction pour impatiante et cyclamen

Citrate trisodique.....	12,9 g
Acide éthylènediaminetétraacétique (EDTA).....	3,8 g
PVP.....	20,0 g
Dieca.....	2,0 g
Eau distillée stérile.....	qsp 1 l
pH 6,4 ± 0,2	

5. Tampon d'extraction pour pélarqonium et bégonia

Trizma base (Tris[hydroxyméthyl]aminométhane).....	12,1 g
PVP.....	20,0 g
Gélatine.....	0,5 g
Tween 20.....	0,5 ml
Eau distillée stérile.....	qsp 1 l
pH 8,6 ± 0,2	

6. Tampon de coating

Na ₂ CO ₃	1,59 g
NaHCO ₃	2,93 g
Eau distillée stérile.....	qsp 1 l
pH 9,6 ± 0,2	

7. Tampon Conjuqué

Polyvinylpyrrolidone (PVP) K 25.....	20 g
Albumine de serum bovin (BSA).....	2g
Tween 20.....	0,5 ml
PBS.....	qsp 1 l

8. Tampon Substrat

Diéthanolamine.....	97 ml
Eau distillée stérile.....	qsp 1 l
ajuster le pH à $9,8 \pm 0,2$	

Erreurs maximales tolérées = 5 %.

Annexe 3

Plan de plaque

2 exemples :

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

	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	TS2	6	8	Tp	2	TS2	6	8	eau
C	Eau ou substrat	Tp	2	TS2	6	8	Tp	2	TS2	6	8	eau
D	Eau ou substrat	TS1	3	Tp	7	9	TS1	3	Tp	7	9	eau
E	Eau ou substrat	TS2	3	Tp	7	9	TS2	3	Tp	7	9	eau
F	Eau ou substrat	1	4	5	TS3	TM1	1	4	5	TS3	TM1	eau
G	Eau ou substrat	1	4	5	TS3	TM2	1	4	5	TS3	TM2	eau
H	eau	eau	eau	eau	eau	eau	eau	eau	eau	eau	eau	eau
						<div style="display: flex; justify-content: space-around; width: 100%;"> TSWV INSV </div>						

TS : témoin sain
 TM : témoin malade
 Tp : témoin tampon de broyage
 1 à 24 : échantillons pour laboratoire