

LNPV

Laboratoire

National de la

Protection des

Végétaux

Espèces légumières du genre

Fragaria sp.

Détection du potexviridae

Strawberry mild yellow edge virus

par la technique sérologique

ELISA

Réf. : Méthode VH / 05/ 11 version a

Laboratoire de référence :

LNPV Unité de virologie des plantes
ligneuses à Bordeaux
Domaine de la Grande Ferrade – BP 81
33 883 Villenave d'Ornon cedex

Mars 2005

SOMMAIRE

0 Introduction

1 Objet

2 Domaine d'application

3 Réactifs sérologiques et produits chimiques

- 3.1. Réactifs sérologiques :
 - 3.1.1. Choix des réactifs
 - 3.1.2. Conservation des réactifs
- 3.2. Produits chimiques et tampons

4 Appareillage et consommables

- 4.1. Appareillage
- 4.2. Consommables et petit matériel

5 Echantillonnage et échantillons

- 5.1. Conditions d'acceptabilité du matériel végétal (échantillons pour le laboratoire)
 - Traitement des échantillons
- 5.2. Conservation et prise de l'échantillon pour l'analyse
- 5.3. Broyage de l'échantillon

6 Mode opératoire

- 6.1. Echantillons de référence
 - 6.1.1 - Témoin positif
 - 6.1.2 - Témoin sain
- 6.2. Déroulement du test ELISA
- 6.3. Lecture des plaques

7 Expression des résultats

8 Bibliographie.

Végétal : *Fragaria* sp.

Détection du *potexviridae Strawberry mild yellow edge Virus* par la technique sérologique ELISA

Avertissements et précautions de sécurité

Les virus phytopathogènes étant généralement admis comme ne présentant aucun caractère pathogène pour l'homme ¹, 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.

Pour toute manipulation d'organismes de quarantaine, on veillera à prendre les précautions nécessaires au cours des manipulations et lors de l'élimination des végétaux et de leurs extraits pour limiter les risques de dissémination.

0-Introduction

Cette méthode est directement liée à la « Directive générale – Techniques qualitatives immuno-enzymatiques de type ELISA : DAS et dérivés » (référence DG/1/98/a parue par note de service DGAL/SDPV/N99 8008 du 22 janvier 1999) disponible au laboratoire de référence.

Ces deux documents sont complémentaires. La méthode ne peut être appliquée qu'en respectant la directive générale.

Cette méthode, qualitative, permet de déclarer contaminé tout échantillon pour lequel la technique met en évidence la présence de la cible recherchée.

1 - Objet

Conformément aux dispositions européennes dans le cadre de la protection des végétaux, le *potexviridae Strawberry mild yellow edge virus* est un organisme de quarantaine sur des végétaux de *Fragaria* L. destinés à la plantation et fait l'objet de contrôles à l'intérieur du territoire national et communautaire et à l'importation vis à vis des Pays Tiers.

La méthode ELISA est une méthode immuno-enzymatique qui permet la détection en série du *Potyviridae Strawberry mild yellow edge virus* sur *Fragaria* sp.

2 – Domaine d'application

La méthode s'applique sur les folioles, les pétioles, les fleurs et les stolons présentant ou non des symptômes de maladie.

¹ Affirmation *a priori*, car non fondée sur des études

3 – Réactifs sérologiques et produits chimiques

3.1 - Réactifs sérologiques :

3 .1.1. Choix des réactifs

Le laboratoire utilisera des réactifs spécifiques de l'espèce virale recherchée.

Avant toute campagne de détection le laboratoire de référence teste un ensemble de réactifs utilisables. Pour une homogénéité des résultats sur le territoire français, il est donc conseillé aux laboratoires effectuant ce type d'analyse d'en référer au laboratoire de référence.

3 .1.2. Conservation des réactifs

Le laboratoire suivra les consignes des fournisseurs de réactifs.

3.2 - Produits chimiques et tampons

Les tampons et/ou leurs protocoles de fabrication et/ou d'utilisation doivent être fournis en même temps que les réactifs, l'utilisateur se conformera aux indications du fournisseur quant à leur utilisation, leur conservation et éventuellement leur préparation.

Produits toxiques : trois produits appartiennent à la catégorie « très toxiques » :

- l'azoture de sodium (NaN₃), qui est utilisé pour prolonger la conservation des tampons,
- la diéthanolamine, qui entre dans la composition du tampon du substrat.
- Les substrats de la phosphatase alcaline utilisé pour la révélation de ces essais.

L'utilisateur veillera à respecter toutes les précautions d'utilisation de ces produits.

4 – Appareillage et consommables

4.1 - Appareillage

Pour la mise en œuvre de cette méthode, le laboratoire disposera des appareils décrits dans la directive générale. Suivant le type de broyeur utilisé, une centrifugeuse (force centrifuge jusqu'à 3000 g) peut être nécessaire.

4.2 - Consommables et petit matériel

Petit matériel nécessaire (liste non exhaustive) :

- Matériel de mesure de volume : pipettes à volume fixe ou réglable et leurs embouts, éprouvettes graduées, etc...
- Différents récipients lavables ou jetables.

5 – Echantillonnage et échantillons

5.1 - Conditions d'acceptabilité du matériel végétal (échantillons pour le laboratoire) - Traitement des échantillons

Le laboratoire spécifie à la demande la composition et les caractéristiques de l'échantillon de laboratoire minimum exigé pour permettre la mise en œuvre opportune de l'essai.

En tout état de cause la masse minimale de tissus qui permet la réalisation d'un essai est d'au minimum un gramme de tissus de pétioles, folioles, stolons sans racine, pédoncules floraux,

fleurs ou fruits verts issus d'au minimum trois organes différents d'un même sujet (ces trois organes différents pouvant être trois feuilles, ou un fruits et deux fleurs...etc). Il est possible sans altérer les résultats de regrouper au maximum les échantillons issus de trois sujets différents en vue de la réalisation d'une prise d'essai.

Les échantillons doivent être frais et turgescents lors de leur réception. Il est toutefois possible de les recevoir sous forme congelés moyennant d'assurer que la chaîne du froid entre le prélèvement et la livraison au laboratoire est respectée. De plus, cette échantillon doit être conditionné de façon à ne pas nécessiter sa décongélation avant son homogénéisation, il doit donc exactement correspondre à la prise d'essai, et ne pas nécessiter de re-conditionnement.

Les échantillons doivent être clairement identifiés.

Les échantillons de laboratoire sont immédiatement stockés au réfrigérateur, ou si cela le nécessite au congélateur.

5.2. –Prise d'essai

Lors la réalisation de la prise d'essai l'échantillon doit être frais et turgescent.

Une prise d'essai de matière végétale sera effectuée et stockée de façon à ce qu'il puisse être utilisable directement pour l'essai (la masse de la prise d'essai est fonction du contenant choisi et de la dilution conseillée par le protocole du fabricant). Par exemple, si le fabricant conseille une dilution au 1/20 et si le contenant permet un volume de 5 ml, la masse de l'échantillon d'analyse ne devra pas excéder 250 mg.

La conservation de la prise d'essai frais est limitée à quelques heures au réfrigérateur, au delà d'une demi journée elle devra être placée au congélateur et la chaîne du froid devra être respectée jusqu'à son utilisation .

5.3 Broyage de l' échantillon

Différentes méthodes de broyage peuvent être utilisées, en fonction de l'appareillage disponible au laboratoire. Toutes les méthodes sont valables à condition de mettre en œuvre les moyens qui permettent d'éviter les risques de contaminations croisées (décontamination avec un produit détergent et au minimum deux rinçages à l'eau permutée ou distillée des contenants non jetables et des matériels d'homogénéisation en contact avec les tissus infectés). Certaines méthodes de broyage nécessitent de réaliser ensuite une centrifugation pour séparer les fragments de tissus qui peuvent gêner le pipetage comme par exemple, le broyage avec un broyeur à rouleau .

Nous recommandons l'utilisation du broyeur à bille (exemple : méthode Gugerli), l'échantillon étant broyé dans un sachet en plastique. La suspension de broyage est récupérée directement dans le sachet muni d'une gaze de filtration. Il n'est ainsi pas nécessaire de procéder à une centrifugation.

Si le dépôt n'est pas immédiat, il faut veiller à conserver les broyats au frais (sur glace ou au réfrigérateur).

6 – Mode opératoire

6.1 - Echantillons de référence

6.1.1 - Témoin positif

Le laboratoire utilise comme témoin positif, un *Fragaria* contaminé. Ce témoin positif peut se présenter sous forme fraîche, congelée ou lyophilisée. Sa positivité est régulièrement vérifiée et peut être comparée à des témoins positifs proposés par les sociétés qui fabriquent des réactifs.

Au moins un couple de puits par plaque est réservé au dépôt d'un témoin positif.

6.1.2 - Témoin négatif

Le laboratoire utilise comme témoin négatif, un matériel végétal de la même espèce. Les organes utilisés devront être identiques.

Au moins un couple de puits par plaque est réservé au dépôt d'un témoin négatif.

6.1.3 – Blanc, témoin tampon

Au moins un couple de puits par plaque est réservé au dépôt d'un témoin tampon.

6.2 Déroulement du test ELISA

L'utilisateur doit se conformer au protocole du fournisseur des réactifs, tout en tenant compte des préconisations données dans la directive générale.

Par exemple le protocole d'essai, fourni en 2004, avec le réactif dirigé contre le *Potexviridae* SMYEV par la société Bioreba AG (ref: version 1.01, auteur BM) stipule, nous citons (informations non reprises dans leur intégralité, se référer au document cité en référence) :

« ...

6.2.1 coating : les anti-corps sont dilués au 1/1000 dans du tampon de coating bicarbonate (50 mM carbonate, Ph 9,6, 0,02% de azide de sodium). La solution est distribuée à raison de 200 µl par puit. La plaque est incubée 4 heures à 30 °C ou une nuit à 4°C. A l'issue de l'incubation, la plaque est vidée, lavée au moins trois fois avec du tampon de lavage Phosphate, Ph 7,4 (140m M de chlorure de sodium, 3 m M de chlorure de potassium, 0,05% de Tween 20). Pour conserver ce tampon plus de deux jours, il est nécessaire de rajouter 0,02% d'azide de sodium. Egoutter pour enlever toute trace de liquide.

6.2.2 extrait de plante : l'extrait est dilué au 1/20 dans du tampon d'extraction (ou tampon de broyage) tris, 20 Mm, Ph 7,4 (137 mM chlorure de sodium ; 3 mM Chlorure de potasse ; 2% PVP 24Kd ; 0,05% Tween 20 ; 0,02% Azide de sodium). Distribuer 200 µl par puits. A l'issue de l'incubation, la plaque est incubée une nuit à 4°C. A l'issue de l'incubation la plaque est vidée lavée au moins trois fois avec du tampon de lavage Phosphate, Ph 7,4 (140m M de chlorure de sodium, 3 m M de chlorure de potassium, 0,05% de Tween 20). Pour conserver ce tampon plus de deux jours, il est nécessaire de rajouter 0,02% d'azide de sodium. Egoutter pour enlever toute trace de liquide.

6.2.3 Conjugué : Le conjugué est dilué au 1/1000 dans le tampon de conjugué tris, 20 m M, Ph 7.4 (137 m M chlorure de sodium ; 3 mM Chlorure de potasse, 1 m M Chlorure de

magnésium ; 2% PVP 24Kd ; 0,05% Tween 20 ; 0,02% Azide de sodium ; 0,2 % BSA). Distribuer 200 µl par puits. La plaque est incubée 5 heures à 30 °C. A l'issue de l'incubation la plaque est vidée, lavée au moins trois fois avec du tampon de lavage Phosphate, Ph 7,4 (140m M de chlorure de sodium, 3 m M de chlorure de potassium, 0,05% de Tween 20). Pour conserver ce tampon plus de deux jours, il est nécessaire de rajouter 0,02% d'azide de sodium. Egoutter pour enlever toute trace de liquide.

6.2.4 Substrat : les pastilles de Pnpp (Para Nitro-phenyl-phosphate) sont diluées à raison de 1 mg / ml dans le tampon de substrat (diethanolamine, 1 M ; 0,02 % Azide de sodium ; Ph 9,8), la plaque est incubée à la température du laboratoire (entre 18 et 25 °C) à l'obscurité.

...»

La composition des tampons, les temps d'incubation, certains paramètres du protocole peuvent varier sensiblement d'un fournisseur à l'autre, il est donc indispensable de se référer systématiquement aux documents qui accompagnent les réactifs ou les kits afin d'assurer un déroulement optimal à la manipulation.

6.3 Lecture des plaques

L'utilisateur doit se conformer au protocole du fournisseur, tout en tenant compte des préconisations données dans la directive générale.

Par exemple le protocole d'essai, fournis en 2004, avec le réactifs dirigé contre le *Potexviridae* SMYEV par la société Bioreba AG (version 1.01, auteur BM) stipule (informations non reprises dans leur intégralité, se référer au document cité en référence) ; nous citons :

« L'absorbance de la dégradation du Pnpp est mesurée à 405 nm, la double lecture 405/492 nm permet de réduire les bruits de fond...

...La lecture de la réaction colorée est observée entre 30 et 120 minutes. »

il est indispensable de se référer systématiquement aux documents du fournisseur afin d'assurer un déroulement optimal à la révélation et des lectures.

7 – Expression des résultats

L'utilisateur se référera à la directive générale et le cas échéant aux recommandations du fournisseur de réactifs, sinon au laboratoire de référence.

La formulation des résultats se fera suivant les recommandations de la directive générale.

8 – Bibliographie

- 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
- Converse, R.H., Martin, R.R. and Spiegel, S. (1987). In: Virus Diseases of Small Fruits; ed. R.H. Converse. U.S. Dep. Agric. Hdbk No. 631, p. 25.
- Frazier (1970). Virus diseases of small fruits and grapevines. University of California, Division of Agricultural Sciences, Berkeley, 290 p.
- Gugerli, P. – 1984 – Une méthode simple pour le broyage de tissu végétal – *Revue suisse Vitic. Arboric. Hortic.* Vol. 16 (2) : 87-88.
- Harris, R.V. (1933). *J. Pomol.* 11: 56.
- Harris, R.V. and King, M.E. (1940). Rep. East Malling Res. Stn. 1939, p. 66.
- Horne, W.T. (1922). Rep. Calif. Agric. Exp. Stn. 1921-1922, p. 122.
- Martin, R.R. and Converse, R.H. (1982). *Acta Hort.* 129: 75.
- Martin, R.R. and Converse, R.H. (1985). *Phytopath. Z.* 114: 21.
- Mathon, M.P., Tavert, G., Malato, G. – 1987 – Comparaison de trois méthodes de broyage d'échantillons végétaux destinés au test ELISA – *Bull. OEPP/EPPO* 17, 97-103.
- Mellor, F.C. and Frazier, N.W. (1970). In: Virus Diseases of Small Fruits and Grapevines, p. 14; ed. N.W.
- Yankulova, M. and Schmelzer, K. (1974). *Virusni bolesti po rastenyala*, pp.33-42.
- Yoshikawa, N., Ohki, S.T., Kobatake, H., Osaki, T. and Inouye, T. (1984). *Ann. Phytopath. Soc. Japan* 50: 659.
- Yoshikawa, N. and Inouye, T. (1986). *Ann. Phytopath. Soc. Japan* 52: 643.

oOo

ANNEXE N°1 EXEMPLE DE PLAN DE PLAQUE

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	EAU											
B	EAU	SUBSTRAT	Ech	Ech	TS1	Ech	Ech	Ech	Ech	TI	Ech	
C			1	2	TS1	3	4	5	6	TI	7	
D			<u>Blanc</u>	Ech	Ech	Ech	TS 2	Ech	Ech	Ech	Ech	
E			<u>Blanc</u>	8	9	10	TS 2	11	12	13	14	
F			Ech	TS 3	Ech	<u>Blanc</u>	Ech	TI	Ech	Ech	Ech	
G			15	TS3	16	<u>Blanc</u>	17	TI	18	19	20	
H	EAU											

Ech 1 à 20 : échantillons

TS : témoin sain

TI : témoin infecté

Blanc : témoin tampon

Le plan de plaque proposé permet de tester 20 échantillons (1 x 2 puits par échantillon). Certaines consignes sont à suivre :

Bordures : à remplir d'eau à chaque étape du test.

Colonne 2 : colonne de dégradation du substrat. Remplir d'eau à chaque étape du test, excepté la dernière où elle sera remplie de substrat. Cette colonne sert de zéro optique lors de la lecture.

Les témoins :

- le « blanc tampon » : 2 x 2 puits. Ces témoins servent à noter le bruit de fond dû au tampon. Remplir les puits de tampon de broyage à l'étape du dépôt de broyage. Sinon, suivre le protocole.
 - les témoins sains : 6 puits qui doivent recevoir 6 (ou 3x2) broyats différents de plantes répondant aux critères décrits par la directive générale.
 - les témoins positifs : 2 x 2 puits, qui servent de témoins-manipulation.
- Ces témoins peuvent être disposés au hasard sur la plaque

oOo