

LNPV

Laboratoire

National de la

Protection des

Végétaux

Végétal : vigne (*Vitis* sp.),

détection des virus

par la technique sérologique

DAS-ELISA

Réf. : Méthode VV•/04/05 version b

Laboratoire de référence :

LNPV Unité de Virologie et de phytoplasmiologie de la vigne
28 rue de Herrlisheim
BP 507
68021 COLMAR Cedex
Tél. : 03 89 22 49 74

Table des matières

Avertissements et précautions de sécurité	3
0. Introduction.....	3
1. Objet.....	3
2. Domaine d'application	3
3.1. Réactifs sérologiques.....	4
3.1.1. Choix des réactifs.....	4
3.1.2. Conservation	4
3.2. Tampons.....	4
3.2.1. Liste des tampons nécessaires.....	4
3.2.2. Conservation	4
3.3. Autres consommables.....	4
3.3.1. Produits	4
3.3.2. Petit matériel	4
4. Appareillage et matériel.....	5
5. Traitement du matériel végétal réceptionné.....	5
5.1. Les prélèvements.....	5
5.2. Conditions d'acceptabilité du matériel végétal (échantillon pour laboratoire).....	5
5.3. Préparation de l'échantillon pour analyse.....	5
6. Mode opératoire d'analyse.....	5
6.1. Prise d'analyse	5
6.2. Échantillons de référence (Cf. Directive générale : § 3.5.1).....	6
6.3. Broyage du matériel végétal.....	6
6.4. Déroulement des quatre étapes de la réaction immuno-enzymatique	6
6.4.1. Coating (IgG).....	6
6.4.2. Lavages	6
6.4.3. Dépôt des extraits.....	6
6.4.4. Lavages	6
6.4.5. Conjugué (IgG-E)	6
6.4.6. Lavages	6
6.4.7. Substrat.....	7
7. Validation et interprétation des résultats.....	7
7.1. Validation des résultats	7
7.2. Interprétation Calcul des seuils	7
7.3. Formulation de la réponse.....	7
8. Sources bibliographiques	8
9. Processus de contrôle inter laboratoires.....	8

VEGETAL : VIGNE (*Vitis sp.*),

DETECTION DES VIRUS

PAR LA TECHNIQUE SEROLOGIQUE DAS-ELISA

Avertissements et précautions de sécurité

Les virus phytopathogènes étant généralement admis comme ne présentant aucun caractère pathogène pour l'homme¹, 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 inactiver ceux présents dans les végétaux, extraits végétaux, supports de culture, effluents liquides, par une procédure appropriée (destruction chimique ou physique) 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**" (disponible au Laboratoire de référence).

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

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

1. Objet

Le présent protocole permet de détecter spécifiquement, en analyses de série, les virus de la vigne par la technique DAS-ELISA.

Les virus de la vigne concernés par cette méthode sont listés dans l'annexe 1 de la réglementation communautaire transposée en France par l'arrêté du 22 novembre 2002 relatif à l'introduction et circulation dans l'Union européenne de végétaux et produits végétaux : Virus de la vigne détectés par technique immuno-enzymatique de type ELISA.

Il est, notamment, utilisable pour ces organismes, dans le cadre des contrôles phytosanitaires réglementaires, à la production et à l'importation et exportation ainsi que dans le cadre de la certification.

2. Domaine d'application

Les organes de vigne analysés peuvent être :

- les feuilles,
- le bois aoûté,
- les racines,
- autres organes, si l'expéditeur joint à son envoi ces organes de plantes confirmées contaminées.

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

Des indications spécifiques à chaque virus sont explicitées dans une « Fiche technique des spécificités ». Ces informations font état des connaissances scientifiques actuelles ou des pratiques issues de l'observation généralement admises dans les laboratoires effectuant ces analyses (annexe 2 : Fac-similé).

Sans constituer des exigences absolues, elles peuvent se révéler utiles pour définir les pratiques optimales ou orienter des axes de recherche car ces paramètres sont réputés pouvoir influencer sur le résultat des dépistages.

La mise à jour de ce document est disponible sur simple demande, elle est assurée par le laboratoire de référence, sur la base de nouveaux résultats d'optimisation, de publications, de tests d'inter comparaison,

3. Réactifs, produits et consommables

3.1. Réactifs sérologiques

3.1.1. Choix des réactifs

Utiliser des réactifs spécifiques (cf. Directive Générale - § 0. Introduction).

Un conseil pour le choix du fournisseur de réactifs sérologiques peut être apporté par le Laboratoire de référence.

3.1.2. Conservation

Suivre les consignes des fournisseurs des réactifs.

3.2. Tampons

3.2.1. Liste des tampons nécessaires

Tampon d'extraction (broyage),

Tampon de coating,

Tampon du conjugué,

Tampon du substrat,

Tampon de lavage.

Utiliser les tampons indiqués sur les fiches des fournisseurs de réactifs (notamment composition des tampons d'extraction).

3.2.2. Conservation

Les solutions tampon concentrées, ou reconstituées prêtes à l'emploi, sont conservées selon les recommandations du fournisseur. En absence, ou pour les solutions entièrement préparées par le laboratoire, une conservation de 1 mois à $5^{\circ}\text{C} \pm 4^{\circ}\text{C}$ est préconisée, au delà, par une procédure appropriée efficace, le laboratoire devra prouver la bonne tenue de ses produits.

3.3. Autres consommables

3.3.1. Produits

Substrat, ..., suivre les consignes des fournisseurs.

3.3.2. Petit matériel

Plaques de microtitration à fond plat, par exemple : E.I.A. 96 de Costar, MaxiSorp F96 de Nunc ou autre type assurant une qualité de réaction équivalente,

Cônes de prélèvement,

Tout ustensile pour prélever l'échantillon (sécateur, ciseaux, emporte pièce, taille crayon, ...).

Tubes pour centrifugation (si décantation nécessaire),

Verrerie pour les préparations et le stockage (fioles et éprouvettes).

4. Appareillage et matériel

En plus de l'appareillage courant d'un laboratoire de virologie (Directive Générale § 0. Introduction), le matériel suivant est utilisé :

- Broyeur de tissus végétaux et petit matériel adapté, par exemple : broyeur à billes (Homex / Bioreba) avec sachets de broyage, broyeur à rouleaux (Pollähne / Méku) avec tubes (type hémolyse), presse à genouillère (Steinel Stössel / Hahn-Kolb), ou presse pneumatique (REC) ou ensemble équivalent permettant le broyage en présence de tampon de broyage.
- Centrifugeuse (si nécessaire) assurant une force centrifuge pouvant atteindre 3.000 g.
- Éventuellement, selon la durée de conservation envisagée (annexe 2), congélateur (- 18 à - 20°C) et/ou hyper-congélateur (- 70 à - 80°C).

5. Traitement du matériel végétal réceptionné

5.1. Les prélèvements

L'objectif de ce document n'est pas de proposer des protocoles d'échantillonnage sur le terrain en parcelle ou sur un lot quelconque de plantes. Ces opérations relèvent de la responsabilité du demandeur (client du laboratoire). Toutefois à titre indicatif, le laboratoire peut orienter son client vers des tables d'échantillonnage dressées à partir de règles mathématiques (exemple : distribution binomiale appliquée aux lots de grandes tailles), voire les procédures de prélèvement de l'ONIVINS (Office National Interprofessionnel des Vins).

5.2. Conditions d'acceptabilité du matériel végétal (échantillon pour laboratoire)

L'échantillon pour laboratoire, constitué de fragment de végétaux (annexe 2), doit arriver au laboratoire en bon état, propre, frais (turgescents) et non nécrosé.

Conservation : Selon la nature du tissu végétal et pour du matériel en bon état à la réception une durée de conservation est donnée à titre indicatif (annexe 2).

5.3. Préparation de l'échantillon pour analyse

Le préparateur veillera à prélever les tissus les mieux conservés. Il opérera selon une procédure adaptée à son contexte (locaux, infrastructures, ...) qui vise à éviter tout risque de confusion entre échantillons ou de contamination d'un échantillon par un autre.

Il est recommandé de préserver un fragment de l'échantillon pour pouvoir effectuer le cas échéant un contrôle à posteriori.

6. Mode opératoire d'analyse

6.1. Prise d'analyse

L'analyse se réalise sur environ 1 à 1,5 g de matériel végétal.

Prélever sur les tissus végétaux constituant l'échantillon pour analyse, la quantité nécessaire à l'aide d'un outil permettant de sectionner, voire de fragmenter, et de pouvoir limiter le risque de contamination (nettoyage aisé). A titre indicatif pour les tissus considérés, les outils suivants sont généralement utilisés :

- feuilles → emporte pièce, ciseaux, ou procédure manuelle, ...
- racines → sécateur,
- bois aigüe → sécateur, taille crayon, scalpel,

6.2. Échantillons de référence (Cf. Directive générale : § 3.5.1)

Des échantillons de vigne "Infectés" (TM) et "Non infectés" (TS), sont traités en parallèle et selon les mêmes conditions que les échantillons à analyser. Les TS sont de même nature (bois, racines, feuilles, ...) que les échantillons à analyser.

Des extraits clarifiés puis aliquotés et congelés peuvent être utilisés mais ils ne valideront pas les étapes d'extraction de la manipulation.

On ajoutera un essai blanc constitué uniquement du tampon d'extraction (Ta).

Rappel : Les étapes validées par les échantillons de référence sont uniquement celles qui sont exécutées dans les mêmes conditions que l'ensemble des échantillons analysés.

6.3. Broyage du matériel végétal

Broyer les tissus végétaux constituant la prise d'analyse en présence du tampon d'extraction. Les appareils généralement utilisés sont :

- Le broyeur à billes.

Son utilisation est facilitée par l'emploi d'une presse (type presse à genouillère ou presse pneumatique) qui écrase au préalable les tissus. La dilacération des tissus se fait dans des sachets spécifiques.

- Le broyeur à rouleaux.

Le broyat, récupéré dans un tube (type hémolyse de 5 ml), est clarifié par centrifugation environ 10 min à une accélération voisine de 3.000 g.

- Le mortier pilon

L'ajout d'azote liquide peut favoriser le broyage des tissus.

Le ratio poids de tissu végétal / volume de tampon est donné par le fournisseur de réactifs sérologiques, en son absence fixer un ratio correspondant à : environ 1 g de tissu végétal broyé dans un volume fixe, compris entre 5 à 20 ml de tampon.

6.4. Déroulement des quatre étapes de la réaction immuno-enzymatique

Suivre en priorité le protocole d'analyse du fournisseur de réactifs (étapes, durées d'incubation, volumes, dilutions).

Il est utile de se référer au : § 3.5.3.1. Plan de plaque, de la Directive Générale.

En absence de consigne précise du fournisseur de réactifs, à titre indicatif, le choix des paramètres peut être le suivant.

6.4.1. Coating (IgG)

Au moment de l'emploi les IgG sont dilués puis homogénéisés dans du tampon Coating.

Remplir les cupules des microplaques à raison de 100 µl (± 10 µl) / cupule.

Incuber à +30°C (± 3°C) ou + 37°C (± 3°C), durée à fixer (± 15mn) comprise entre 2 et 4 h.

6.4.2. Lavages

Au minimum 3.

6.4.3. Dépôt des extraits

Remplir les cupules à raison de 100 µl (± 10 µl) / cupule avec les extraits de plante.

Incuber au réfrigérateur à +5°C (± 4°C) pendant une nuit.

6.4.4. Lavages

Au minimum 5.

6.4.5. Conjugué (IgG-E)

Au moment de l'emploi les IgG-E sont dilués puis homogénéisés dans du tampon conjugué.

Remplir les cupules à raison de 100 µl (± 10 µl) / cupule.

Incuber à +30°C (± 3°C) ou + 37°C (± 3°C), durée à fixer (± 15 mn) comprise entre 2 et 4 h.

6.4.6. Lavages

Au minimum 3.

6.4.7. Substrat

Pour un marquage à la phosphatase alcaline (le plus fréquent), le substrat, 4-nitrophényl phosphate, est mis en solution dans du tampon substrat, 1 mg/ml.

Remplir les cupules des microplaques à raison de 100µl (± 10 µl) / cupule.

Incuber à +30°C (± 3°C) ou +37°C (± 3°C).

6.4.8. Lecture

Pour le marqueur phosphatase alcaline et le 4-nitrophényl phosphate comme substrat, la lecture se fait à 405 mn.

Plusieurs lectures peuvent être réalisées à des temps différents.

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 30 mn, 1 h et 2 h, voire plus si nécessaire (réaction lente) après ajout de la solution de substrat.

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, durée, fréquence, 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 mener avec soin constance et rigueur, notamment les opérations de lavage.

7. Validation et interprétation des résultats

7.1. Validation des résultats

Voir la Directive générale : § 3.5.4.2.

7.2. Interprétation Calcul des seuils

En absence de recommandations explicites, de la part du fournisseur de réactifs, l'interprétation des résultats peut se pratiquer sur la base du calcul de deux seuils, notés S1 et S2.

Remarque : Le responsable technique peut, en le justifiant, ajouter aux TS des échantillons « assimilés non infectés » (Cf. Directive générale § 3.5.4.3).

$S1 = (\text{« Moyenne DO corrigées TS »} \times 2) - (\text{« Moyenne DO corrigées TS »} \times 2) \times 20\%$.

$S2 = (\text{« Moyenne DO corrigées TS »} \times 2) + (\text{« Moyenne DO corrigées TS »} \times 2) \times 20\%$.

DO corrigée = DO brute – DO substrat (c.à d. : zéro optique effectué sur substrat seul).

7.3. Formulation de la réponse

L'analyse est qualitative, trois catégories sont définies, exemple : positif, indéterminé (ou douteux), négatif.

Positif : La valeur de DO de l'essai est supérieure ou égale à S2

La réponse est : « pathogène recherché présent dans le matériel végétal analysé ».

Indéterminé : La valeur de DO de l'essai est comprise dans l'intervalle S1-S2

La réponse est : « résultat indéterminé, des analyses complémentaires sont nécessaires ».

Négatif : La valeur de DO de l'essai est inférieure ou égale à S1

La réponse est : « pathogène recherché non détecté dans le matériel végétal analysé ».

Exemple :
Moyenne DO TS = 0.050



Remarque : Lorsque le laboratoire ne peut pas conclure de façon satisfaisante et si des regroupements ont été demandés par le client et si la disponibilité du matériel végétal le permet, des analyses complémentaires individuelles peuvent être pratiquées sur chacune des plantes composant le regroupement.

Le recours à des techniques différentes (amplification génique) peut également être envisagé.

8. Sources bibliographiques

Boscia D., Digiario M., Fresno J., et al. Elisa for the detection and identification of grapevine viruses. In : *Sanitary selection of the grapevine. Protocols for detection of viruses and virus-like diseases*. B. Walter, Ed., INRA Editions, Paris, Les Colloques n°86, 1997 : 129-155.

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, 475-83

Vollen A., Bartlett A., Bidwell D. E., Clark M. F., Adams A. N., 1976. The detection of viruses by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). *J. Gen. Virol.* 33, 165-167

Un dossier est tenu à disposition au laboratoire de référence

9. Processus de contrôle inter laboratoires

Périodiquement des comparaisons inter laboratoires sont réalisées par le Laboratoire de référence.

Annexe 1

Virus de la vigne détectés par technique immuno-enzymatique de type ELISA

Virus responsables de dégénérescence (népovirus)

ArMV : Arabis mosaic virus

GFLV : Grapevine fan leaf virus

ArMV + GFLV (multi infection)

BBLMV : Blueberry leaf mottle virus

RRV : Raspberry ringspot virus

SLRSV : Strawberry latent ringspot virus

TBRV : Tomato black ring virus

Virus responsables de dépérissement (népovirus)

PRMV : Peach rosette mosaic virus

ToRSV : Tomato ringspot virus

TRSV : Tobacco ringspot virus

Virus responsable d'Enroulement viral

GLRaV 1 : Grapevine leafroll-associated virus 1 (ampélovirus)

GLRaV 3 : Grapevine leafroll-associated virus 3 (ampélovirus)

GLRaV 2 : Grapevine leafroll-associated virus 2 (clostérovirus)

Annexe 2

Fiche technique des spécificités

Avertissement : Ces informations, non exhaustives, font état des connaissances scientifiques actuelles ou des pratiques, issues de l'observation, généralement admises dans les laboratoires effectuant ces analyses.

Sans constituer des exigences absolues, les ordres de grandeur donnés peuvent se révéler utiles pour définir des pratiques optimales de prélèvement et d'analyse, car pour chacun de ces tableaux, les paramètres pris en compte sont réputés influencer sur le résultat des dépistages.

Népovirus	Ampélovirus	Clostérovirus
ArMV, BBLMV, GFLV, PRMV, RRV, SLRSV, TBRV, ToRSV, TRSV	GLRaV 1, GLRaV 3	GLRaV 2

A - Organes analysés

	Népovirus	Ampélovirus - Clostérovirus
Feuilles	Jeune feuille - 2 ^{ème} à 4 ^{ème} feuille étalée	Feuille adulte jusqu'avant sénescence
Bois	Zone nodale - 2 à 3 nœuds - Ø 10 mm (environ)	
Racines	Environ 10 cm long - Ø ≥ 3 mm	

B – Époques de prélèvement

Compte tenu de variations significatives de la « charge virale » souvent observées durant la période végétative (notamment pour le GLRaV 2), les organes de type bois (voire racine) sont à privilégier.

	Népovirus	Ampélovirus	Clostérovirus
Feuilles ⁽¹⁾	À partir de mai (<i>stade 12</i>)	À partir de juin (<i>stade 23</i>)	1 ^{ère} période furtive début juin (<i>st 19</i>) Puis à partir d'août (<i>st 33-35</i>)
Bois	Hiver – Sur bois dormant		
Racines	Hiver – Sur plant en dormance		

1) - Dans nos conditions nous avons observé ces périodes propices à la détection. Toutefois, nous recommandons, selon les régions, de contrôler la détectabilité des agents viraux dans des plantes « contaminées » de référence.

C – Regroupements

Dans certaines situations, à la demande du client, le regroupement des prélèvements de plusieurs plantes peut être toléré.

	Népovirus	Ampélovirus	Clostérovirus
Feuilles	20 plants	15 plants	5 plants
Bois	10 plants		5 plants
Racines	10 plants	4 plants	

Toutefois si l'on veut bénéficier des potentialités de détectabilité offertes par la technique cette pratique n'est pas à conseiller.

D - Mode et durée de conservation recommandés

Concernant les virus suivants : ArMV, GFLV, GLRaV 1, GLRaV 2, GLRaV 3

	Climatisation (environ 18 à 25°C)	Réfrigération (5°C, ± 4°C)	Congélation (pouvant atteindre -18 à -20°C)	Hyper congélation (pouvant atteindre -70 à -80°C)
Feuilles	24 - 48 h *	1 semaine *	1 an	2 - 3 ans
Bois ou Racines	1 semaine *	1 mois *	1 an	2 - 3 ans
Extrait	1 à 3 h	12 à 24 h	6 mois à 1 an	2 à 3 ans

* Si protection contre dessiccation

E – État de conservation du matériel

Des altérations constatées à la réception peuvent compromettre les possibilités de stockage.

Les tissus végétaux, au moment de l'extraction des antigènes, ne doivent pas être dégradés (nécroses).

Pour le bois, les tissus doivent être exempts de nécroses internes (vérifier l'aspect du plan de coupe lors de la fragmentation).

Pour les feuilles, les tissus doivent présenter un bon état de turgescence.