Liberté • Égalité • Fraternité
RÉPUBLIQUE FRANÇAISE

MINISTERE DE L'AGRICULTURE ET DE LA PECHE

Direction Générale de l'Alimentation Sous-direction de la Qualité et de la Protection des Végétaux **Mission « Laboratoires »** Suivi par : Christian BAIN Tél (/ Fax / Mail) : 0149555496	**CIRCULAIRE** **DGAL/SDQPV/C2007-8006** **Date: 13 juin 2007**

Date de mise en application : immédiate
Annule et remplace : VS/04/06 version b
Nombre d'annexe : 1
Confidentialité : tout public

Objet : Méthode officielle de détection du virus de la Rhizomanie de la betterave par test biologique suivi du test ELISA.

Mots-clés : méthode de détection - rhizomanie betterave - BNYVV

Destinataires	
Pour exécution : Toutes DRAF Tous Laboratoires	Pour information :

Cette méthode décrit la façon de mettre en évidence le virus de la rhizomanie de la betterave (BNYVV) lui même véhiculé par un champignon du sol.

Le Sous Directeur de la Qualité
Et de la Protection des Végétaux

Joël MATHURIN

Ministère de l'Agriculture et de la Pêche
Direction Générale de l'Alimentation
Service de la Qualité Alimentaire et des Actions Vétérinaires et Phytosanitaires

LNPV

Laboratoire
National de la
Protection des
Végétaux

Sol : Détection du virus de la Rhizomanie (Beet Necrotic Yellow Vein Virus) de la Betterave par test biologique suivi du test ELISA

Réf. : Méthode VS/04/07 Version c

Laboratoire de référence :
LNPV Unité de Flore Pathogène des Sols
93 rue de Curembourg
45 404 FLEURY-LES-AUBRAIS CEDEX

------2007

SOL, DETECTION DU VIRUS DE LA RHIZOMANIE (BEET NECROTIC YELLOW VEIN VIRUS) DE LA BETTERAVE PAR TEST BIOLOGIQUE SUIVI DU TEST ELISA

SOMMAIRE

Avertissements et précautions de sécurité	3
0. Introduction	3
1. Objet	3
2. Domaine d'application	3
3. Définitions	3-4
4. Principe	4
5. Réactifs et produits	5
5.1 Réactifs	5
5.2 Produits	5
6. Appareillage	6
6.1Gros matériel	6
6.2 Petit matériel	6
7. Echantillonnage et échantillons	6
7.1 Arrivée des échantillons au laboratoire	6
7.2 Préparation et conservation des échantillons	7
8. Mode opératoire	7
8.1 Test biologique	7
8.2 Analyse des plantes par ELISA	8-9-10
9. Interprétation des résultats	10
9.1 Détermination de deux seuils	10-11
9.2 Interprétation	11
10. Cas particulier	11
10.1 Analyse sur eau terreuse	11
10.2 Analyse sur eaux décantées	12
11. Formulation du résultat d'analyse	12
12. Conditions de conservation et d'élimination de l'échantillon	12
12.1 Echantillon de terre	12
12.2 Echantillon de plante piège et broyats	12
Annexe 1 : Composition des tampons utilisés pour le test ELISA	13-14
Annexe 2 : procédure particulière pour l'échantillonnage	15
Annexe 3 : Plan de plaque	16

SOL, DETECTION DU VIRUS DE LA RHIZOMANIE (BEET NECROTIC YELLOW VEIN VIRUS) DE LA BETTERAVE PAR TEST BIOLOGIQUE SUIVI DU TEST ELISA

AVERTISSEMENTS ET PRECAUTIONS DE SECURITE

Les virus phytopathogènes ne présentant aucun caractère de pathogénicité 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.

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.

0. INTRODUCTION

La méthode ici décrite est une méthode qualitative : présence, absence du virus.

1. OBJET

Cette méthode s'applique en routine à la détection, dans le sol, du virus de la Rhizomanie (BNYVV), lui-même véhiculé par un champignon (*Polymyxa betae*). Cette détection s'insère dans le cadre des contrôles phytosanitaires (dans le cas particulier de cette méthode il s'agit du sol et /ou d'autres supports de culture et matières fertilisantes) destinés aux zones protégées de l'Europe communautaire conformément aux dispositions européennes. Ce virus est classé organisme de quarantaine, visé par les annexes IB et IIIB de la directive 2000/29/CE modifiée. Les zones protégées concernées sont le Danemark, la Finlande, le Royaume-Uni (Irlande du Nord), le Portugal (Açores), la Suède (à l'exception des zones des circonscriptions de Bromölla, Hässelholm, Krianstadt et Ostra Göinge dans la province de Skäne), et depuis 1987 la Bretagne en France. Compte tenu des évolutions fréquentes de la réglementation, il est nécessaire de consulter les derniers textes en vigueur.

2. DOMAINE D'APPLICATION

La méthode s'applique à tout sol, matières fertilisantes et supports de culture dans la mesure où il permet un développement racinaire des plantes pièges suffisant pour réaliser le test dans les conditions définies ci-après.

3. DEFINITIONS

Anticorps : protéine qui reconnaît de façon spécifique un antigène (ici le virus de la Rhizomanie).

BNYVV : Beet Necrotic Yellow Vein Virus.

Conjugué : anticorps sur lequel est fixé une enzyme.

D.O. : Densité optique.

Enzyme : molécule qui catalyse une réaction biochimique en agissant sur un substrat.

g : accélération centrifuge relative.

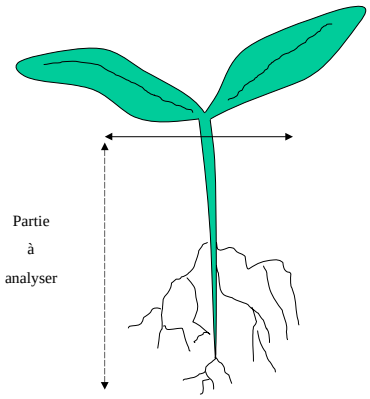
Substrat de l'enzyme : solution incolore qui se colore en présence de l'enzyme spécifique. L'intensité de la coloration est mesurée au spectrophotomètre (lecteur de plaque).

T.S. : Témoin sain (terreau stérile).

T.M. : Témoin infecté (terre reconnue contaminée).

4. PRINCIPE

La détection du virus de la Rhizomanie dans le sol se fait de manière indirecte par piégeage du virus à l'aide d'une plante-piège. Des semis de cette plante-piège sont réalisés dans les échantillons de sol à tester. Dès la germination, le champignon vecteur (*Polymyxa betae*) pénètre dans les radicelles de la plante, se multiplie et transmet ainsi le virus de la Rhizomanie à la plantule s'il est porteur de virus (virulifère).



La détection porte sur la partie tige + racines de la plantule (voir schéma ci-contre). Les particules virales peuvent également être trouvées au niveau du collet ou dans les feuilles de la plante mais ceci en phase tardive de la maladie.

Ces racines sont ensuite analysées par la méthode immuno-sérologique ELISA. Les antigènes (virus) se lient à des anticorps préalablement fixés sur un support solide. Ensuite, on dépose des anticorps conjugués à des enzymes qui reconnaissent les antigènes spécifiquement. La présence des antigènes est alors révélée par l'addition du substrat de l'enzyme qui donne lieu à une réaction colorée mesurée par photométrie à 405 nm.

L'analyse est donc réalisée en 2 temps :

- Piégeage du virus par un test biologique.
- Mise en œuvre de la technique ELISA sur les plantes issues du test biologique de piégeage.

Pour cette deuxième étape, la directive générale "Techniques qualitatives immuno-enzymatiques de type ELISA : DAS et dérivés" fixe les exigences à respecter lors des test ELISA et constitue donc le document de référence.

5. REACTIFS ET PRODUITS

➢5.1. Réactifs

Utiliser des réactifs spécifiques (cf. Directive Générale "Techniques qualitatives immuno-enzymatiques de type ELISA : DAS et dérivés"). Un conseil pour le choix du fournisseur de réactifs sérologiques peut être apporté par le laboratoire de référence. Il est conseillé 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".

5.1.1. ***Anticorps et anticorps conjugués*** pour la détection du virus de la Rhizomanie :
Les conseils de préparation, de conservation et les conditions d'emploi des réactifs sont précisés par le fournisseur dans la notice accompagnant les réactifs.

5.1.2. ***Substrat de l'enzyme*** : le substrat utilisé est celui correspondant à l'enzyme fixé sur l'anticorps conjugué choisi.

➢5.2. Produits

5.2.1. ***Terreau stérile***

- Terreau horticole.
- La stérilisation s'effectue par 2 autoclavages successifs à 105°C environ pendant 1 heure, à 24H d'intervalle.
- Attendre 10 jours minimum après le dernier autoclavage avant d'utiliser le terreau.

5.2.2. ***Eau permutée, ou distillée ou osmosée stérile ou eau ultra-pure***.

5.2.3. ***Désinfectant à action*** *virucide*

5.2.4. **A*lcool 70°*** : **produit inflammable**, éloigner des sources de chaleur.

5.2.5. ***Les tampons***

Conformément à la directive Générale "Techniques qualitatives immuno-enzymatiques de type ELISA : DAS et dérivés", les tampons peuvent être fournis par le fournisseur de réactifs ou préparés au laboratoire.

Dans le cas où les tampons sont préparés par le laboratoire, leur composition est donnée par l’annexe 1.

6. APPAREILLAGE

➢6.1. Gros matériel

- Chambre climatisée : 6 000 - 10 000 lux.
  15 h jour / 9h nuit.
  Humidité Relative proche de 80 %.
  préalablement réglée à T° : 25° C ± 4°C.
- Congélateur réglé à T° : <- 15° C.
- Réfrigérateur réglé à T° : 5° C ± 4°C.
- Centrifugeuse (2000 à 3000 g) (Facultatif).
- Lecteur de plaques de microtitration.
- Broyeur (Ex : broyeur à billes, broyeur à rouleaux…).
- Balance (± 0,1 g).
- Dessicateur lent réglé à 25° C ± 5°C (peut être remplacé par un séchage à l'air libre).
- Etuve préalablement réglée à 37° C ± 5°C.
- pH mètre (si préparation des tampons par le laboratoire).
- Autoclave.

➢6.2. Petit matériel

- Sac plastique ou tout autre contenant étanche.
- Tamis à 5 mm (tamisage des terres).
- Nappe d'irrigation.
- Godet percé : pot individuel de volume 150 ml.
- Couvercle transparent pouvant recouvrir le pot (type boîte de Petri).
- Barquette pouvant contenir 6 pots de 150 ml.
- Papier absorbant.
- Semence de betterave sensible à la rhizomanie et enrobée de fongicide contre les fontes de semis.
- Tamis pour dépotage (nettoyage des racines).
- Plaque (type ELISA).
- Couvercle de plaque (adhésifs ou non adhésifs).
- Micro-pipette et embout correspondant.
- Eprouvette.
- Tube ou sachet de broyage.
- Bonbonne + multidistributeur pour tampon de rinçage ou pissette ou laveur de plaque automatique.
- Boîte de Pétri ou cuve en plastique pour dilution.

7. ECHANTILLONNAGE ET ECHANTILLONS

➢7.1. Arrivée des échantillons au laboratoire

Un échantillon représente un prélèvement effectué sur le terrain suivant le protocole en Annexe 2, soit 2,5 l de terre/hectare.

Les conditions d'envoi des échantillons au laboratoire sont indiquées en Annexe 2. Elles doivent être conformes à la réglementation concernant l'expédition d'organismes de quarantaine.

➢7.2. Préparation et conservation des échantillons

Dans les jours suivant la réception et en fonction de l'humidité de l'échantillon, il est séché au dessicateur lent (ou à l'air libre) pour être tamisé à 5 mm avant stockage à température ambiante dans des contenants hermétiques. On évitera de trop dessécher la terre.

Ce stockage avant analyse ne pourra excéder 1 mois.

8. MODE OPERATOIRE

Toutes les précautions visant à éviter des contaminations entre les échantillons devront être prises. En l'occurrence, le matériel mis au contact des échantillons devra être jeté ou désinfecté entre chaque échantillon.

➢8.1. Test biologique

8.1.1. ***Prise d'essai***

La prise d'essai est constitué de 6 x 150ml de terre à analyser bien homogénéisée.

8.1.2. ***Essai témoin***

TS - 3 pots de 150 ml de terreau stérile (témoin sain pour le test Elisa) avec 2,019 g de charbon végétal actif.

TM - 2 pots de 150 ml avec de la terre reconnue infectée par la Rhizomanie (témoin malade pour le test Elisa) avec 1,346 g de charbon végétal actif.

Commencer le semis-empotage par le témoin sain, puis les échantillons à analyser et terminer par le témoin malade.

8.1.3.***Test de piégeage***

- Mélanger la terre à analyser de manière à bien homogénéiser l'échantillon.
- Incorporer 4,038 g de charbon végétal actif : CVA (captant les éventuelles molécules chimiques responsable de phytotoxicité) dans 900ml de cette terre.
- Remplir 6 pots de 150 ml au 7/8ème avec ce mélange.
- Semer les graines de betteraves en surface à raison d'une vingtaine de graines par pot. NB : semer plus de graines si le taux de germination du lot de graines est faible.
- Compléter les 6 pots avec la terre à analyser.
- Placer les 6 pots dans une barquette avec la nappe d'irrigation dans le fond.
- Arroser les pots par le fond pour une remontée par capillarité avec de l'eau permutée ou distillée ou osmosée sans atteindre la saturation.
- Recouvrir avec des couvercles transparents.
- Placer la barquette dans la chambre climatique (voir conditions en 6.1.).
- Surveiller la levée et enlever les couvercles quand elle a lieu.
- Arroser régulièrement les pots par le fond à saturation.
- **Eviter d'éclabousser lors de l'arrosage**.
- Analyser les plantes entre 21 et 28 jours après la mise en pot.

➢8.2. Analyse des plantes par ELISA

8.2.1. *Préparation du matériel végétal*

8.2.1.1. **Dépotage**

- Dépoter chaque pot individuellement afin de dégager les radicelles des débris (organiques et terreux) par lavage délicat à l'eau courante sur un tamis maillé de 1 à 2 mm (qui a pour but de retenir les plantules) reposant sur l'évier.
- Conserver les plantules ainsi nettoyées pot à pot.

Si l'analyse des échantillons est impossible dans les 24 h suivant le dépotage, il est préférable soit de conserver les échantillons à 5° C ± 4° C enrobés dans du papier aluminium pour éviter le dessèchement (48 h maximum), soit à <-15° C pour une conservation plus longue (dans une limite maximale de 6 mois).

8.2.1.2. **Pesée**

- La pesée du matériel végétal s'effectue pot à pot : chaque échantillon est divisé en 5 sous-échantillons correspondant à 5 pots choisis parmi les 6 (le $6^{ième}$ pot sert de complément de matériel végétal si besoin). Pour les TS, les 3 pots sont utilisés. Pour le TM seul 1 des pots est utilisé.
- Peser 0,5 g ± 0,1 g par pot de "tige + radicelle" (cf schéma Chapitre 4) prélevées sur les plantules.
- Conserver le restant soit à 5° C ± 4° C (si une deuxième analyse dans les 48 h suivant le dépotage est nécessaire en cas de problèmes), soit à <-15°C (pour une conservation maximale de 6 mois).

Remarque : Si à la pesée le poids de 0,5 g n'est pas atteint, on note le poids obtenu pour chaque sous-échantillon concerné. Le volume de tampon de broyage utilisé est alors proportionnel au poids obtenu.

8.2.1.3. **Broyage**

- Broyer le matériel végétal pesé précédemment avec un tampon de broyage (cf Chapitre 5) dans un rapport de 0,5 g/4,5 ml de tampon.
- Clarifier le jus obtenu s'il est trop épais par centrifugation à 2 000-3 000 g pendant 30 secondes ou par filtration à travers une gaze.
- Ces broyats ainsi obtenus sont analysés par la technique ELISA dans les 24 h suivant le broyage. Le stockage des échantillons en attente de la mise en plaque se fait à 5° C ± 4° C.

8.2.2. *Déroulement du test ELISA*

La Directive Générale "Techniques qualitatives immuno-enzymatiques de type ELISA : DAS et dérivés", précise les exigences à satisfaire lors de cette étape de l'analyse. Des indications sur la méthode à suivre sont également données par les fournisseurs de réactifs.

8.2.2.1. **Plan de plaque** (exemple en Annexe 3)

- Les puits de bordure ne sont pas utilisés (phénomènes aléatoires observés modifiant la D.O.). Ils sont remplis d'eau distillée, osmosée ou ultra-pure lors du dépôt d'anticorps, du dépôt des broyats et du dépôt du conjugué.
- Les témoins sains, au minimum 3, sont répartis uniformément sur la plaque. Chaque témoin sain est issu d'un broyat différent (1 puit/TS, répété 1 fois).
- Chaque échantillon est déposé dans deux puits adjacents.
- Le témoin positif, est issu d'un seul broyat (1 puits/TM, répété 1fois).
- Deux puits au minimum sont réservés au témoin tampon de broyage : le jus de plante est remplacé par du tampon de broyage (contrôle du bruit de fond).

8.2.2.2. **Dépôt du premier anticorps**

Le volume réactionnel par puits est indiqué par le fournisseur.
- Calculer le volume nécessaire de la solution contenant les anticorps pour remplir le nombre de plaques déterminé par le nombre d'échantillons.
- Diluer les anticorps suivant la dilution dans le volume du tampon diluant calculé précédemment, soit conseillée par la notice du fournisseur.
- Bien homogénéiser le mélange.
- Déposer dans chaque puits le volume demandé.
- Recouvrir la plaque avec un couvercle.
- Mettre à incuber en chambre humide dans une étuve préalablement réglée à 37° C ± 5° C ou suivant les prescriptions du fournisseur.

8.2.2.3. **Rinçages**

Les rinçages peuvent être effectués à l'aide d'un laveur de plaques ou manuellement de la manière suivante :
- Vider vigoureusement les plaques.
- Procéder ainsi à 3 rinçages de 3 min avec du tampon lavage.
- Lors du dernier rinçage, éliminer le restant en tapant les plaques sur du papier absorbant. Ne pas laisser sécher la plaque. A ce stade, les dépôts de broyats étant longs, il est préférable d'égoutter une plaque et de laisser les autres en attente dans du tampon de lavage.

8.2.2.4. **Dépôt du broyat**

- Déposer le volume de broyat préconisé par le fournisseur suivant le plan de plaque établi.
- Recouvrir la plaque avec un couvercle.
- Incuber une nuit à 5° C± 4° C.

8.2.2.5. **Rinçages**

- Effectuer un premier rinçage rapide à l'eau distillée, osmosée ou ultra-pure.
- Procéder ensuite comme indiqué au 8.2.2.3.

8.2.2.6. **Dépôt du deuxième anticorps** (suivant fournisseur)

Cette étape est prévue par le fournisseur de certains sérums (ex : ADGEN). Procéder comme pour le premier anticorps en suivant les indications du fournisseur.

8.2.2.7. **Rinçages**

Procéder comme indiqué au 8.2.2.3.

8.2.2.8. **Dépôt du conjugué**

Le principe est identique au dépôt des anticorps (§ 8.2.2.2).

8.2.2.9. **Rinçages**

- Procéder comme au 8.2.2.3.
- Terminer par un rinçage à l'eau distillée, osmosée ou ultra-pure pour éliminer les bulles.

8.2.2.10. **Dépôt du substrat**

Le substrat utilisé dépend de l'enzyme fixée sur l'anticorps conjugué et donc du fournisseur. Le substrat est dissout dans un tampon substrat juste avant sa mise en plaque.

- Déposer cette solution dans tous les puits de la plaque au volume préconisé par le fournisseur.
- Recouvrir la plaque d'un couvercle recyclabe.
- Incuber à température ambiante et à l'obscurité suivant les prescriptions du fournisseur.

8.2.3. ***Lecture des plaques***

La D.O. se mesure à une longueur d'ondes de 405 nm. La référence de lecture se fait sur le zéro électrique de l'appareil, c'est-à-dire sur l'air (sans plaque).

- Effectuer des lectures de D.O. à 30 min, 1 h et 2 h. **Ces temps sont ajustés en fonction de la cinétique de la réaction enzymatique.**
- Les témoins infectés sont indicateurs d'une bonne détection.
- L'observation des références saines et tampon de broyage permet d'estimer l'importance des réactions non spécifiques.

Les plaques sont validées si tous les critères définis la Directive Générale "Techniques qualitatives immuno-enzymatiques de type ELISA : DAS et dérivés" sont satisfaisants.

9.INTERPRETATION DES RESULTATS

La Directive Générale "Techniques qualitatives immuno-enzymatiques de type ELISA : DAS et dérivés" précise les exigences à satisfaire lors de cette étape.

➢9.1. Détermination de deux seuils

Seuil 1 = MTS + (3 x écart type des D.O. des TS)
Seuil 1bis = MTS x 1,1
Seuil 2 = MTS x 2

TS : témoin sain.
MTS : moyenne de la densité optique des témoins sains.

La valeur du seuil 1 choisie parmi les 2 modes de calcul (1 et 1bis) est celle qui correspond à la valeur calculée la plus forte.

➢9.2. Interprétation

La combinaison des deux seuils permet de définir 3 zones :

	S1		S2	
Echantillon négatif		Echantillon douteux		Echantillon positif

Les échantillons interprétés douteux devront faire l'objet d'une analyse de confirmation. Pour cela, les reliquats de ces échantillons pourront être analysés à nouveau par le laboratoire de référence s'ils satisfont aux conditions définies au paragraphe 7 (volume suffisant, durée de conservation d'1mois maximum). A défaut, un nouvel échantillon de sol devra être constitué.

10. CAS PARTICULIER

➢10.1. Analyse sur eau terreuse

Un échantillon d'eau terreuse se définit comme un échantillon de consistance liquide ou semi-liquide à forte teneur en éléments solides récupérables par décantation.

10.1.1. ***Test biologique***

10.1.1.1 **Préparation de l'échantillon**

Le volume d'échantillon requis est fonction de sa teneur en éléments solides. Il doit être suffisant pour mettre en œuvre la procédure suivante :

- Laisser décanter l'échantillon.
- Récupérer la phase solide de l'échantillon.
- Mélanger ¼ de cette phase solide avec ¾ de sable.

10.1.1.2. **Prise d'essai**

- La prise d'essai est constituée de 6 pots de 150 ml du mélange.

10.1.1.3. **Essai témoin**

- TS – 3 pots de 150 ml avec un mélange ¼ de terreau stérile, ¾ de sable avec 2,019 g de CVA.
- TM - 2 pots avec un mélange ¼ de terre contaminée, ¾ de sable stérile avec 1,346 g de CVA.

10.1.1.4. **Test de piégeage**

- Procéder comme au 8.1.3.

10.1.2. ***Test ELISA***

Procéder comme au 8.2.

➢10.2. Analyse sur eaux décantées

Un échantillon d'eau décantée se définit comme un échantillon de consistance liquide à faible teneur en éléments solides.

10.2.1. ***Test biologique***

10.2.1.1 **Test de piégeage**

- Mélanger 450 ml de terreau stérile et 450 ml de sable
- Remplir 6 pots de 150 ml avec ce mélange
- Procéder ensuite comme indiqué au 8.1.3 en arrosant avec l'échantillon d'eau décantée à analyser en remplacement de l'eau d'arrosage.

10.2.1.2. **Prise d'essai**

- La prise d'essai est constituée de 3l d'eau décantée.

10.2.1.3. **Essai témoin**

- TS – 3 pots avec un mélange ½ de terreau stérile, ½ de sable avec 2,0.19 g de CVA. Arroser avec de l'eau permutée, distillée ou osmosée.
- TM - 2 pots avec un mélange ½ terreau stérile, ½ sable avec 1,346 g de CVA. Arroser tout au long du test avec un mélange décanté de 300 ml de terre contaminée + 1 litre d'eau permutée ou distillée ou osmosée.

10.2.2. ***Test ELISA***

Procéder comme au 8.2.

11. FORMULATION DU RESULTAT D'ANALYSE

Les résultats seront exprimés sous une forme du type :

- **échantillon positif** : Virus de la Rhizomanie détecté dans l'échantillon analysé.
- **échantillon négatif** : Virus de la Rhizomanie non détecté dans l'échantillon analysé (selon la limite de détection de la méthode Elisa),
- **échantillon douteux** : Résultat sérologique indéterminé selon les limites des méthodes de détection utilisées.

12. CONDITIONS DE CONSERVATION ET D'ELIMINATION DE L'ECHANTILLON

➢12.1. Echantillon de terre

- Stocker l'échantillon pendant environ 6 mois sous abri (non climatisé) pour permettre un éventuel test complémentaire.
- Le désinfecter avant élimination.

➢12.2. Echantillon de plante piège et broyats

- Conserver à <–15°C tous les échantillons et broyats jusqu'au résultat du test.
- Les éliminer après stérilisation.

Annexe 1

Composition des tampons utilisés pour le test ELISA

(cas où les tampons sont préparés par le laboratoire)

Tampon PBS 20 X

- Na Cl - Chlorure de sodium ..... 160 g
- KH_2 PO_4 - Dihydrogénophosphate de potassium ..... 4 g
- Na_2 H $PO_{4;}$ 12 H_2O - Di - Sodium hydrogenophosphate ..... 58 g
- K Cl - Chlorure de potassium ..... 4 g
- Eau distillée, osmosée ou ultra-pure .....1 000 ml

Autoclaver à 121°C environ pendant 30 minutes.
Conservation 1 mois maximum à température ambiante à l'abri de la lumière.

Tampon de lavage (PBS - Tween)

- PBS (20X) ..... 50 ml
- Tween 20 (dilué au 1/10) ..... 5 ml
- Eau distillée, osmosée ou ultra-pure ..... 1000 ml

Conservation 15 jours maximum à température ambiante.

Tampon diluant anticorps (carbonates)

- Na2 CO3 - Carbonate de sodium ..... 1,60 g
- Na H CO3 - Hydrogenocarbonate de sodium ..... 2,94 g
- Eau distillée, osmosée ou ultra-pure .....1 000 ml

Conservation 1 mois maximum à 5° C ± 4°C.

Tampon diluant conjugué (PBS - BSA - Tween)

- PBS (20X) préalablement autoclavé ..... 50 ml
- Tween 20 (dilué au 1/10) ..... 10 ml
- BSA (albumine bovine) ..... 2 g
- Na N3 –Azide de sodium* ..... 0,2 g
- Eau distillée, osmosée ou ultra-pure .....940 ml

Conservation 1 mois maximum à 5° C ± 4°C.
** Azide de sodium : produit très toxique, utiliser des gants lors de sa manipulation*
L'utilisation d'azide de sodium dans la préparation permet d'améliorer la conservation du tampon. Toutefois, pour une conservation du produit 1 mois maximum, l'utilisation de ce produit peut être évitée en remplaçant l'eau distillée par de l'eau distillée stérile.

Tampon de broyage (PBS - PVP - Tween)

- PBS (20X) ..... 50 ml
- Tween 20 (dilué au 1/10) ..... 5 ml
- PVP - Polyvinylpyrolidone ..... 20 g
- Eau distillée, osmosée ou ultra-pure ..... 950 ml

Conservation 1 semaine maximum à 5° C± 4°C.

Tampon de dilution de substrat

Le tampon de dilution du substrat peut s'acheter préparé dans le commerce (ex. : Substrate buffer (x 5) chez Boehringer).

Suivre les indications du fournisseur d'anticorps et de conjugué : le tampon est fonction du substrat et de l'enzyme.

Exemple :

- Diethanolamine ..... 97 ml
- Eau distillée, osmosée ou ultra-pure ..... 903 ml

Ajuster à l'aide d'un pH mètre, le pH à 9,8 ± 0,3 avec HCl fumant.

Ne pas inverser l'ordre car dégagement d'acide cyanhydrique.

Annexe 2

Procédure particulière pour l'échantillonnage

Compte tenu du caractère "hétérogène en agrégats" (foyers) de la plupart des champignons du sol, la procédure formelle consiste à découper une parcelle en sous-unités de 1000 m^2 et à réaliser 10 prises de 250 ml (une tous les 10 m) par sous-unités, regroupées en un échantillon.

Quand une parcelle ne souffre d'aucun soupçon particulier, il est envisageable "d'élargir la maille" à raison d'un échantillon par hectare, constitué du regroupement de 10 à 15 prises de 250ml. Pour les grandes parcelles, et compte tenu des coûts engendrés, on ne retiendra que 3 échantillons, répétoriés sur un plan, par tranche de 10 hectares homogène.

En situation de zones potentiellement contaminées, le protocole de base (un échantillon = 10 prises sur 1000 m^2) doit être adopté.

<u>- Préparation des échantillons de sol pour envoi au laboratoire.</u>

. Etiquetage identique au prélèvement de plantes avec repérage sur un plan.

. Ne jamais laisser les sacs au soleil ou à une température supérieure à 35° C, même momentanément.

. Stocker, si nécessaire avant envoi, au frais (cave) et au maximum un mois.

. Répartir les échantillons en containers résistants (caisses ou cartons opaques).

. Prévenir le laboratoire destinataire.

Annexe 3

Type d'analyse : Rhizomanie

Plan de plaque

(exemple avec 5 échantillons – étape : dépôt du broyat)

	1	*2*	*3*	*4*	*5*	*6*	*7*	*8*	*9*	*10*	*11*	*12*
A	**X**	**X**	**X**	**X**	**X**	**X**	**X**	**X**	**X**	**X**	**X**	**X**
B	**X**	**Ts** 3	**B** 1	4	2	4	**D** 1	4	**E** 1	4	**X**	
C	**X**	**Ts** 3	1	4	2	4	1	4	1	4	**X**	
D	**X**	**A** 1	4	2	5	**Ts**	**P**	2	5	2	5	**X**
E	**X**	1	4	2	5	**Ts**	**P**	2	5	2	5	**X**
F	**X**	2	5	3	**C** 1	3	5	3	**Ts**	3	**Tm**	**X**
G	**X**	2	5	3	1	3	5	3	**Ts**	3	**Tm**	**X**
H	**X**	**X**	**X**	**X**	**X**	**X**	**X**	**X**	**X**	**X**	**X**	**X**

X	Eau distillée, osmosée ou ultra-pure
Ts	Témoins sains
Tm	Témoin malade (positif)
P	Témoin tampon de broyage
A.....E	Echantillon
1.....5	Sous-échantillon