



## **Laboratoire de Virologie et de Biologie Moléculaire**

### **Offre de prestation - volet 2**

## **Recommandations pour l'échantillonnage et l'envoi des échantillons**

L'offre de prestation du laboratoire de virologie et de biologie moléculaire (« LVBM ») du centre technique interprofessionnel des fruits et légumes (Ctifl) comprend la liste des analyses réalisées au laboratoire et leur tarification (volet 1) et les recommandations auprès des demandeurs pour l'échantillonnage et l'envoi des échantillons (volet 2). Les prestations proposées s'appliquent dans le cadre des conditions contractuelles de vente du LVBM.

La qualité d'un diagnostic en laboratoire dépend de la nature du matériel testé et transmis par le demandeur de l'analyse.

Afin de les analyses au laboratoire selon les protocoles adaptés, le laboratoire doit disposer d'échantillons répondant aux exigences présentées dans ce document.

### **Recommandations à appliquer lors des prélèvements**

Suivant le pathogène recherché, la concentration en particules infectieuses peut varier en fonction de l'âge de l'arbre mais également des tissus analysés. Afin d'obtenir une réponse fiable à un test, il est indispensable de prélever les échantillons de nature adaptée et en quantité suffisante au test visé. La nature des échantillons est mentionnée dans le volet 1 détaillant la liste des analyses réalisées par le LVBM.

### **Prélèvements de feuilles, pétioles ou bourgeons (noyer) : tests sérologiques et moléculaires au laboratoire**

*Tableau 1 : Nombre de feuilles jeunes pleinement étalées à prélever sur arbres fruitiers en fonction du test demandé.*

Nature du test	Test sérologique laboratoire PPV, PDV, PNRSV, RBDV	Test sérologique laboratoire CLRV noyers (sur pétioles ou bourgeons)	Test hybridation moléculaire laboratoire PLMVd	Test moléculaire PCR laboratoire PPV, ...
Nombre de feuilles <u>minimum</u> à prélever par arbre ou échantillon à tester	<b>4 feuilles (jeunes plants) 10 feuilles (arbre adulte)</b>	<b>4 bases de pétioles ou 4 bourgeons terminaux</b>	<b>4 feuilles (jeunes plants) 8 feuilles (arbre adulte)</b>	<b>4 feuilles (jeunes plants) 10 feuilles (arbre adulte)</b>
Nombre de feuilles <u>maximum</u> par échantillon à tester (groupements d'échantillons ou pool – hors ELISA PPV)	<b>12</b>	<b>12 bases de pétioles Ou 12 bourgeons terminaux</b>	<b>10</b>	<b>30</b>

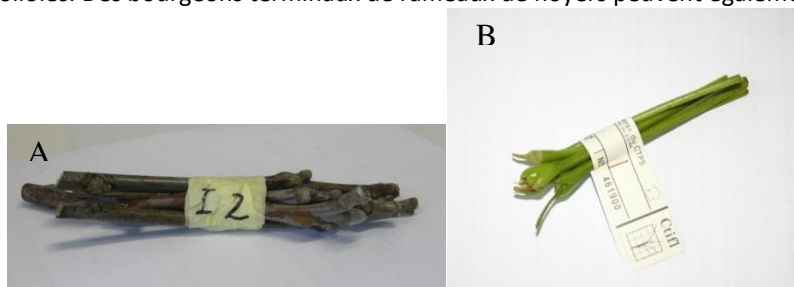
En période végétative, prélever des **feuilles jeunes pleinement étalées** sur le pourtour de l'arbre ou du plant, en conservant le pédoncule.

En cas de symptômes douteux, prélever les feuilles avec symptômes.



Exemple de prélèvement de feuilles de framboisier

Dans le cas particulier des noyers, prélever la base (renflement) des pétioles sur le pourtour de l'arbre à tester et éliminer les folioles. Des bourgeons terminaux de rameaux de noyers peuvent également être prélevés.



Exemple de prélèvements sur noyer : bourgeons terminaux (A) et bases de pétioles (B)

### Prélèvements de rameaux greffons : tests biologiques en serre et pépinière, tests moléculaires au laboratoire

*Tableau 2 : Nombre de rameaux greffons (ou baguettes greffons) de 30 cm à prélever sur arbres fruitiers en fonction du test demandé.*

Nature du test	Indexage <sup>(1)</sup> rapide Serre PPV	Examen partiel Test biologique serre	Examen complet Tests biologiques serre + pépinière	Test moléculaire PCR Laboratoire Phytoplasmes, PPV
Nombre de rameaux greffons <i>minimum</i> à prélever par arbre ou échantillon	<b>3</b>	<b>4</b>	<b>4 + 5</b>	<b>4</b>

<sup>(1)</sup> **Indexage** : opération consistant à greffer en double exemplaire un fragment d'écorce sur un indicateur, sélectionné pour sa sensibilité et sa capacité à exprimer après greffage un ou plusieurs pathogènes de type virus, viroïde ou phytoplasme.

- Prélever du matériel jeune issu du **bois de l'année** (dont la concentration en particules infectieuses est la plus élevée). En cas de faible pousse, il est possible de prélever du bois de 2 ans.
- Prélever du matériel **aoûté** ou partiellement aoûté. Les rameaux herbacés se conservant difficilement, des nécroses peuvent se former durant leur conservation et diminuer ainsi la fiabilité du test.
- Prélever des rameaux d'une longueur de **25 à 30 centimètres**. Si cette longueur minimale ne peut être atteinte, pour maintenir la fiabilité et la représentativité du test, il faut augmenter le nombre recommandé de greffons à prélever.
- Effeuilier les baguettes en veillant à ne pas blesser l'écorce.

Afin que l'échantillon soit le plus représentatif de l'arbre contrôlé il est recommandé de prélever sur le pourtour de l'arbre à raison d'une baguette par charpentière.

En cas de symptômes douteux, il est recommandé de faire au moins un prélèvement sur le rameau ou la charpentière porteur de symptômes.



Exemple de prélèvement de rameaux greffons de cerisier

### Stockage avant envoi

Les échantillons prélevés doivent être expédiés rapidement au laboratoire (envoi de matériel végétal frais). En attente d'envoi au LVBM les échantillons doivent être stockés un maximum de 48h dans les conditions appropriées afin d'éviter leur dégradation : 4°C, sous sac plastique fermé, en hygrométrie saturante.

### Expédition

Afin de préserver au mieux la qualité des échantillons et d'accélérer leur prise en charge ceux-ci doivent être expédiés selon les recommandations suivantes :

- Grouper les échantillons d'un même arbre en un seul lot maintenu fermement par un lien solide aux deux extrémités (pour les baguettes greffons par un élastique par exemple) ou dans un sac plastique (feuilles)
- Identifier chaque lot individuellement avec un numéro ou une référence unique. Cette identification peut reprendre les informations permettant d'identifier l'origine de l'arbre prélevé : espèce, cultivar, coordonnées de l'arbre, expéditeur. Ces informations doivent être inscrites de manière lisible et indélébile sur l'étiquette.
- Placer la base des baguettes (uniquement) dans un tissu ou un papier absorbant humidifié, et placer l'ensemble des lots dans un sac plastique fermé hermétiquement,
- Placer le tout dans un colis
- Préparer un bon de livraison ou document récapitulatif reprenant les informations de la demande, les informations d'identification des échantillons et toute indication complémentaire (nature du test demandé, présence de symptômes en parcelle,...)  
*Les échantillons (tout produit ou objet à soumettre à analyse) adressés au laboratoire doivent être accompagnés du bon de livraison, ou du bon de commande le cas échéant, **apposé à l'extérieur du colis** afin d'être protégé de toute souillure et pour que l'agent chargé de l'ouverture puisse prendre les précautions nécessaires en fonction de la nature de l'échantillon et de la demande.*
- Déposer le colis directement au laboratoire ou l'expédier à l'adresse du laboratoire par messagerie express 24h-48h si possible en début de semaine, au plus tard le mercredi.