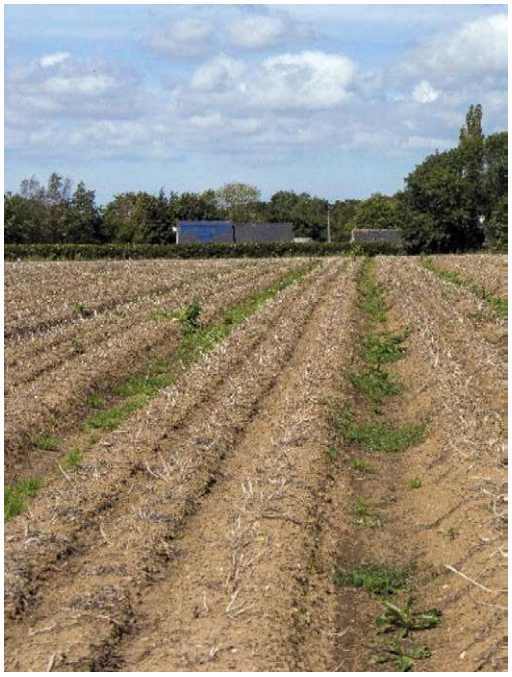
CERTIFICATION

Comment Bretagne-Plants détecte la présence de virus ?

Chaque fin d'été après défanage et avant récolte, inspecteurs et préleveurs saisonniers entament une tournée de prélèvements d'échantillons de tubercules, en complément de ceux effectués par les producteurs eux-mêmes. Ces prélèvements s'effectuent dans toutes les parcelles acceptées après inspection en végétation. Un travail intense à faire sur un délai court qui permettra ensuite d'effectuer différents types de tests, en particulier pour déterminer le taux de virus et vérifier l'absence de bactéries de quarantaine. Itinéraire…

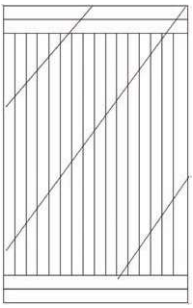
Partie 1. Prélèvement de tubercules



1. Le prélèvement des tubercules au champ

Équipés de gants et d'un seau, les inspecteurs doivent arpenter les parcelles pour y prélever un certain nombre de tubercules. Ce nombre à prélever est déterminé en fonction de la surface de la parcelle ainsi que de la classe attribuée après inspection en végétation. Il peut varier de 110 à 400 tubercules.

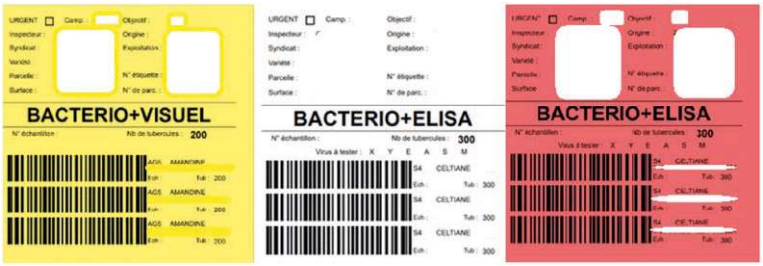
Les prélèvements sont réalisés par sondage à intervalle régulier sur l'ensemble de la parcelle, y compris dans les fourrières et les passages de tracteur, en suivant la plus grande diagonale du champ et des lignes parallèles à cette diagonale (selon la taille et la forme du champ) pour avoir une bonne représentativité de l'ensemble de la parcelle (cf. schéma ci-contre).



Un seul tubercule par pied différent est pris, en prenant garde que ce tubercule soit non « peleux » et de calibre de 35/45 mm dans la mesure du possible.

2. L'identification

Les tubercules prélevés sont ensuite regroupés dans des sacs filets neufs. Sur chaque filet est apposé une étiquette de couleur rouge, blanche ou jaune sur laquelle apparaissent différentes informations comme le numéro de producteur, le numéro de parcelle, la variété ou la classe.



Les sacs filets sont ensuite acheminés vers le hangar de réception de Hanvec pour analyse.

Partie 2. Préculture

1- Réception des échantillons

Les échantillons sont déposés dans le hangar de réception par les techniciens terrain sur les palettes identifiées.

Un code-barres par échantillon est remis au laboratoire. La réception des échantillons est faite sur le logiciel labo (FNLabo). Les codes-barres permettent d'anonymiser les échantillons pour le laboratoire. Ce code-barres suit l'échantillon dans toutes les étapes jusqu'au rendu des résultats.

2- Œilletonnage

Les lots sont ensuite œilletonnés. La couronne de chaque tubercule du lot est prélevée grâce à une gouge (cuillère à billes de melons). Les œilletons sont mis en sac avec une étiquette d'identification. Les coquilles (reste du tubercule) sont conservées en sac avec étiquette d'identification en vue de l'analyse bactériologique.

Les sacs d'œilletons sont mis pendant 15 minutes dans une solution contenant de l'acide gibbérellique afin de lever la dormance des tubercules.

Les sacs sont mis à sécher.

Le lendemain les échantillons sont plantés. L'étiquette d'identification est agrafée à la barquette.

3- Pousse des plantes en serre

Au bout de 10 jours les premiers germes apparaissent.

Puis les plantes poussent. Les plantes sont prêtes à être prélevées en moyenne après 6 à 8 semaines de plantation.

4- Prélèvement des feuilles

Les lots sont prêts à être prélevés lorsque 75 % des œilletons ont donné une plante. L'apex de chaque plante est coupé. Une seule plante par œilleton est prélevée. Les feuilles sont placées dans une caisse avec le code-barres identifiant le lot.

Les caisses passent ensuite à la presse.

5- Pressage des jus

Les feuilles sont pressées par groupe de 5. Le jus de chaque groupe de feuille est récupéré dans des tubes, qui sont disposés sur un support contenant 96 places, comme la plaque d'analyse ELISA[1]. Le code-barres est collé sur la feuille de suivi qui est également la feuille de résultats.

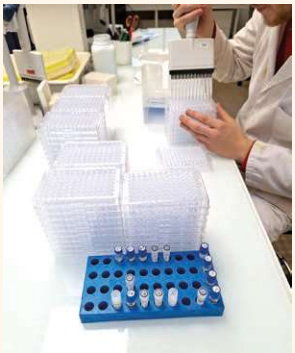
Les tubes sont ensuite transférés au laboratoire pour l'analyse ELISA[1].

1. Elisa : Enzyme LInked ImmunoSorbent Assay.

Partie 3. L'analyse ELISA au laboratoire

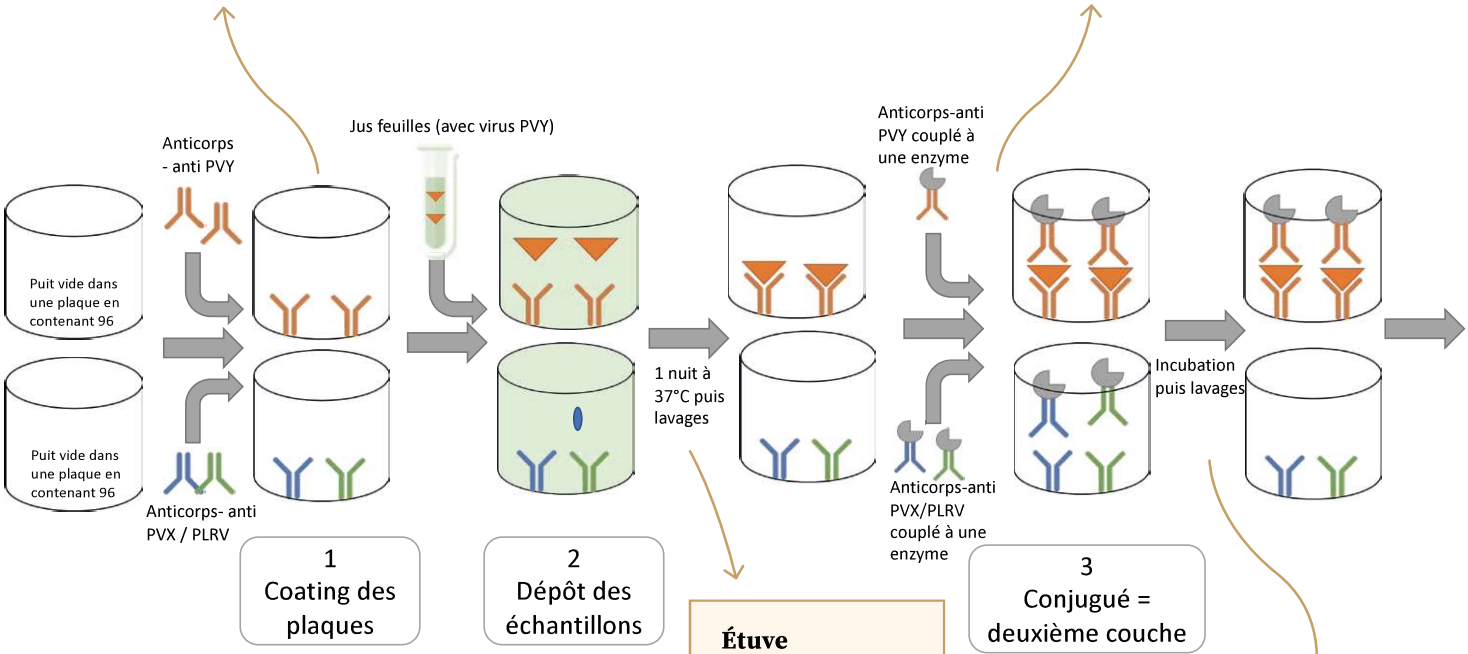
Coating des plaques

Une première couche est accrochée au fond de la plaque. Cette couche est composée de l'anticorps spécifique de chaque virus recherché. À Bretagne-Plants, nous avons, après de nombreux tests, décidé de combiner des virus. Ainsi pour une analyse 3 virus, nous avons 2 plaques (au lieu de 3). Et pour une analyse 6 virus, nous avons 4 plaques (au lieu de 6).



Deuxième couche

Une seconde couche est déposée sur le jus des feuilles. Elle est composée de l'anticorps (le même que la première couche) couplé à une enzyme (= « conjugué »), la phosphatase alcaline. Après une nouvelle incubation de 4 h à 37°C dans l'obscurité, le substrat permettant d'activer l'enzyme est ajouté.

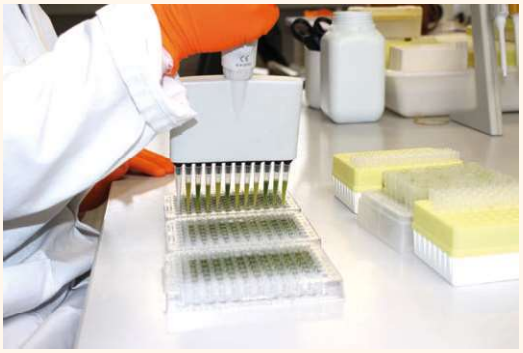


Étuve

Les plaques sont incubées pendant 1 nuit à 37°C.

Dépôt des échantillons

Les jus de plantes sont déposés dans les plaques. Pour une analyse 3 virus dans 2 plaques différentes, la première ciblant PVY et la seconde PLRV et PVX.

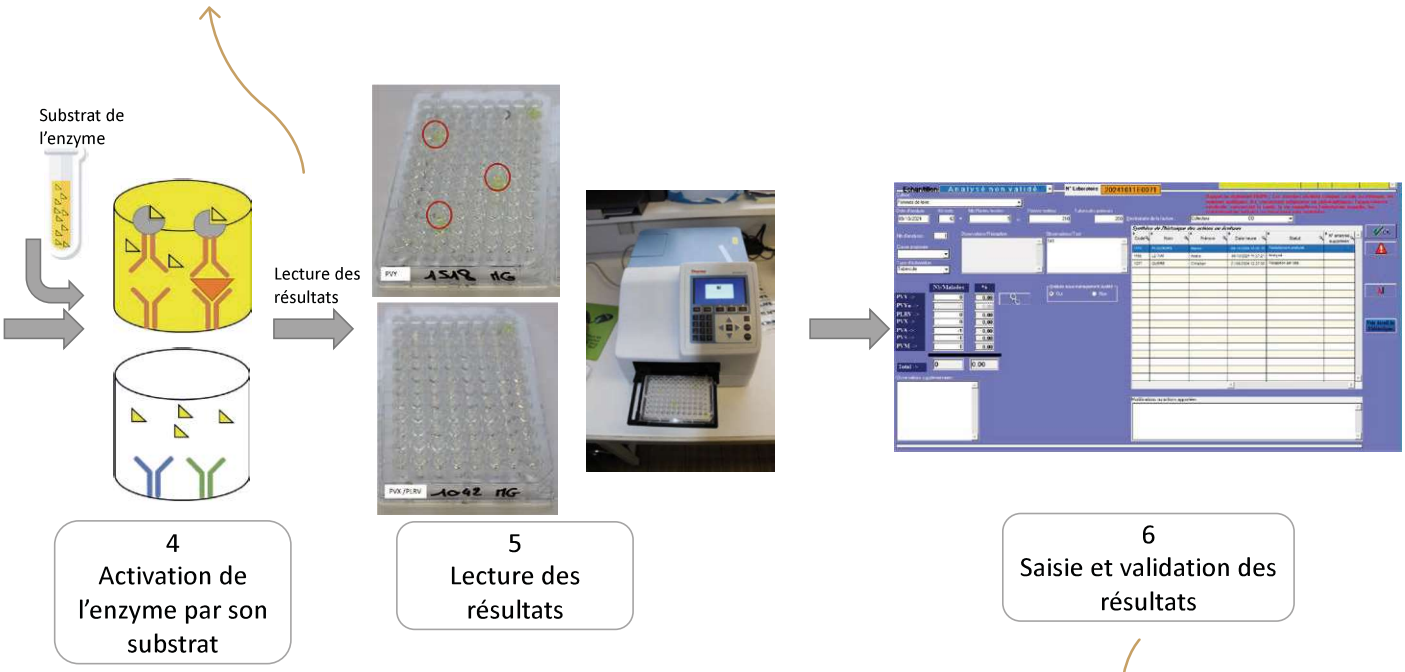


Lavages

Entre chaque étape, plusieurs lavages sont effectués avec des tampons, ou de l'eau grâce ce laveur de plaques, ou au robinet.

Lecture des résultats

Le contact entre l'enzyme et son substrat produit une réaction colorée jaune. Un puit jaune signifie que le virus recherché est présent dans le jus des feuilles testé. La position des puits « jaune » est reportée sur la feuille des résultats. Puis une vérification par une lecture au spectrophotomètre est faite. Cet appareil permet, par la mesure à la longueur d'onde de 405 nM, de détecter les puits positifs et d'enregistrer le tout afin de garantir la traçabilité des résultats.



Saisie et validation des résultats

Le lendemain, les résultats sont saisis informatiquement dans le logiciel du laboratoire. Les saisies sont vérifiées avant d'autoriser la validation administrative des résultats.