

UTILISATION DU TEST ELISA POUR LA SELECTION DE CANNES A SUCRE RESISTANTES A LA MULTIPLICATION DU VIRUS DE LA MOSAIQUE (SCMV)

J.C. DEVERGNE, P. BAUDIN, Michèle CHATENET, L. CARDIN

RESUME — La méthode immunoenzymatique E.L.I.S.A. (type «sandwich»), appliquée au virus de la mosaïque de la canne à sucre, peut détecter 1 ng/ml de virus purifié SCMV-D. Dans la canne, le test ELISA permet de révéler un certain nombre d'infections latentes : il apparaît, en cela, beaucoup plus fiable que le contrôle visuel, très dépendant des conditions de milieu. Dans de jeunes plantes inoculées expérimentalement, le test ELISA permet également d'étudier le comportement vis-à-vis de l'infection. Son utilisation pour la mise en évidence de seedlings présentant une certaine «résistance» à la multiplication du virus est discutée.

Mots-clés : mosaïque; canne à sucre; Test ELISA; sélection sanitaire; sélection variétale; résistance.

INTRODUCTION

Le virus de la Mosaïque de la canne à sucre (SCMV) occasionne sur les variétés sensibles de cannes des symptômes graves de mosaïque foliaire, accompagnés d'une baisse de rendement qui peut atteindre 32 % (par exemple à Porto Rico sur la variété B 34104 en première repousse (GONZALEZ-RIOS et ADSUAR, 1953).)

Les moyens dont nous disposons actuellement pour lutter contre cette maladie sont uniquement préventifs :

- d'une part, **la sélection sanitaire** qui consiste à s'assurer de l'absence du virus dans les cannes destinées à être multipliées en conditions contrôlées,
- d'autre part, **la recherche de nouvelles variétés moins sensibles** à la Mosaïque, obtenues par croisements.

Dans les deux cas, qu'il s'agisse de l'indexage systématique de cannes cultivées en pépinière ou en serre de Quarantaine, ou bien du criblage de «seedlings» résistant à la multiplication virale, nous devons faire appel à des méthodes de diagnostic qui nous permettent de détecter de façon sûre la présence du virus dans les plantes infectées naturellement ou expérimentalement.

Actuellement, les deux méthodes les plus utilisées sont le **contrôle visuel** et l'**indexage biologique** par inoculation mécanique d'hôtes sensibles comme le Maïs ou le Sorgho. Certains tests sérologiques (test au latex,

double diffusion en milieu gélosé) ont été également préconisés (BAUDIN, P. 1977). Toutefois, ces méthodes seraient avantageusement remplacées par un indexage sérologique beaucoup plus rapide, automatisable et de surcroît très sensible comme c'est le cas du test ELISA. Nous précisons ici quelques résultats obtenus par cette méthode pour la détection du SCMV dans la canne à sucre en insistant particulièrement sur ses possibilités de détection d'infections latentes.

MATERIEL ET METHODES

Nous avons utilisé dans cette étude une souche du virus de la Mosaïque de la canne à sucre originaire du Cameroun, appartenant au type SCMV-D.

INFECTIONS EXPERIMENTALES ET CONTROLE VISUEL

Les clones à indexer vis-à-vis de la Mosaïque sont des **seedlings** originaires de la Guadeloupe et destinés à un réseau d'essai variétal en Afrique où sévit la souche SCMV-D. Six boutures à un œil par clone, provenant de la station de sélection de l'IRAT de la Guadeloupe, sont prégermées à 30° pendant 2 à 4 jours dans du papier de cellulose bien humidifié. Les plants germés sont alors repiqués en pots de 2 litres dans un mélange en proportion égale de tourbe et pouzzolane, régulièrement arrosé

(1) DEVERGNE (J.-C.), CARDIN (L.) — Institut National de Recherche Agronomique (INRA) - Station de Pathologie Végétale, 06602 Antibes.
(2) BAUDIN (P.), CHATENET (M.) — Institut de Recherches Agronomiques Tropicales (IRAT) - B.P. 5035 - 34032 Montpellier Cedex.

O. R. S. T. O. M. Fonds Documentaire

N° : 15727, 21

Cote : B

par une solution équilibrée d'éléments nutritifs. Les pots sont placés en serre protégée des insectes, climatisée entre 12 et 25°. Deux traitements insecticides par semaine complètent cette protection.

Inoculation

Environ 15 jours à 3 semaines après repiquage, les plants, généralement au stade 3 feuilles, sont inoculés sur la dernière feuille déroulée avec des extraits de canne infectée par le SCMV-D. L'inoculum obtenu par broyage de 1 g de feuille dans 4 ml de tampon Sørensen 0,02 M pH 7,2 additionné de 0,2 % de mercaptoéthanol est appliqué par frottement sur les feuilles préalablement saupoudrées de carborundum (400 mesh). L'inoculation se fait en fin d'après-midi pour éviter aux plantes une trop forte insolation.

Contrôle visuel

Les premiers symptômes peuvent apparaître quelques jours après l'inoculation à la base de la nouvelle feuille qui se dégage du fuseau foliaire. Ils se manifestent par une mosaïque plus ou moins accentuée et dont l'évolution est notée chaque semaine.

La notation est faite de la façon suivante :

- aucun symptôme : plante apparemment saine.
- symptôme douteux (Σ) : très légères décolorations difficiles à différencier de certains troubles physiologiques
- symptôme net (+ à + + +) : Mosaïque plus ou moins accentuée.

INDEXAGE IMMUNOENZYMATIQUE ELISA

Préparation de l'antigène viral

L'antigène SCMV-D est maintenu sur Maïs et purifié selon une technique mise au point par l'un de nous (BAUDIN, 1977). L'extrait brut est obtenu par broyage de 100 g de feuilles dans 300 ml d'un tampon Tris - EDTA 0,05 M de pH 7,2 en présence de mercaptoéthanol, filtré sur étamine et clarifié par une centrifugation à faible vitesse, puis par un traitement au chloroforme dans le rapport 1v : 4v. Le virus, présent dans la phase aqueuse, est sédimenté par une ultracentrifugation de 3 H à 21000 t/mn (Spinco Rotor 30), repris dans un tampon Tris-EDTA 0,005 M et déposé au sommet d'un gradient de saccharose 10-40 %. Après une centrifugation de 3 H à 25000 t/mn (Rotor SW 25), la zone au niveau de laquelle se trouve l'antigène viral est prélevée à l'aide d'un analyseur ISCO, soumise à une nouvelle ultracentrifugation et le culot final repris dans un faible volume de tampon borate 0,02 M.

Obtention des antisérums

Plusieurs antisérums ont été préparés par immunisation de lapins avec des extraits de virus SCMV-D purifiés,

à raison de 4 à 6 injections intramusculaires rapprochées (3-6 jours d'intervalle) de 0,8 à 2 mg de virus chacune, en présence d'adjuvant complet de FREUND, suivies d'injections mensuelles de rappel.

Un sérum anti SCMV-D (n° 106) obtenu après quatre mois d'immunisation a été choisi pour cette étude, en raison de son titre satisfaisant (1/1024 en épreuve **ring-test**) et de l'absence de réaction vis-à-vis d'extraits de canne saine. En immunodiffusion double (agarose véronal), ce sérum donne deux lignes de précipitation. L'une située très près du réservoir contenant l'antigène purifié, correspond au virion intact qui diffuse très lentement dans le milieu gélosé. L'autre située plus près du réservoir contenant le sérum, n'apparaît qu'avec des extraits semi-purifiés (culots de la première ultracentrifugation) ou avec des extraits purifiés dégradés par la pyrrolidine; elle correspond à un antigène viral de type «soluble» (WAGNER et DALE, 1966; LANGENBERG, 1973). On contrôle que ces deux lignes de précipitation subsistent après épuisement du sérum par un extrait de canne saine.

Epreuve immunoenzymatique

Un conjugué anti SCMV-D (n° 1061) a été préparé par marquage à la phosphatase alcaline (SIGMA type VII) de γ -globulines obtenues après plusieurs relargages du sérum (n° 106) par le sulfate de sodium anhydre. Le couplage se fait en présence de glutaraldéhyde selon la technique d'AVRAMEAS (1969).

Le test immunoenzymatique proprement dit est réalisé dans des cuvettes PAK (GILFORD, Ohio). On adopte la méthode dite sandwich de CLARK et ADAMS (1977) dans laquelle le virus se trouve doublement couplé à des anticorps adsorbés sur le support «coating» et aux anticorps marqués du conjugué.

Chaque incubation antigène-anticorps a lieu à 37°C pendant 3 heures. Le dépôt des réactifs «coating», conjugué, substrat, les lavages au PBS-Tween et la lecture photométrique à 405 nm sont effectués automatiquement à l'aide d'un analyseur GILFORD EIA PR 50. Les variations propres aux différents essais sont mentionnées dans les résultats.

RESULTATS

DETECTION IMMUNOENZYMATIQUE DU VIRUS DE LA MOSAÏQUE DE LA CANNE A SUCRE DANS DES EXTRAITS PURIFIÉS

Le virus purifié selon la méthode de BAUDIN est dilué dans un tampon TRIS - EDTA 0,005 M de pH 7,2 contenant 0,2 % de BSA.

Le conjugué anti SCMV-D (n° 1061) étant utilisé au 1/800, la densité optique (D.O.) lue après une incubation de 30 minutes du substrat à 37°C, est, pour l'extrait dosé

à 250 ng/ml, de 0,5 unité supérieure à celle du témoin. Le seuil de détection ($DO_{E-T} > 0,05$) est alors de 4 ng/ml (figure 1).

Si l'on prolonge le temps d'hydrolyse, les valeurs de D.O. augmentent rapidement entre 30 et 60 minutes. Après une heure d'incubation, l'extrait à 250 ng/ml fournit une DO_{E-T} égale à 1,2 (moyenne de 10 lectures) alors que le seuil de détection se situe au voisinage de 1 ng/ml soit 0,25 ng de virus détecté dans chaque puits. Après 90 minutes, ce seuil n'est pas modifié, bien que les D.O. soient encore un peu plus élevées, principalement dans la zone de concentrations situées entre 30 et 125 ng/ml.

DETECTION IMMUNOENZYMATIQUE DU VIRUS DE LA MOSAÏQUE DANS DES EXTRAITS DE CANNE INFECTÉE

Le milieu d'extraction choisi est le même tampon TRIS-EDTA 0,05 M que celui utilisé pour l'indexage biologique ou dans les premières phases de la purification du virus. Ce tampon s'est souvent montré bien meilleur que le tampon phosphate PBS + Tween, plus communément employé dans les épreuves ELISA.

Le broyage de 1 g de tissu frais de canne dans 8 ml du milieu d'extraction est effectué au mortier en présence de sable de Fontainebleau ou à l'aide d'un microbroyeur de type ultraturax. Les extraits bruts ainsi obtenus sont clarifiés par simple décantation à 4°C pendant au moins 12 heures avant d'être déposés dans les puits; parfois, ils sont préalablement dilués au 1/5 ou 1/10 dans le tampon TRIS-EDTA 0,005 M.

Dans les mêmes conditions expérimentales que celles décrites pour l'analyse immunoenzymatique des préparations purifiées, les densités optiques fournies par les extraits bruts de canne saine sont parfois relativement élevées; selon les essais, elles peuvent varier de 0,05 à 0,20 unité pour une lecture effectuée après seulement une heure d'incubation du substrat. Ce «bruit de fond» non négligeable augmente au cours de l'incubation, ce qui interdit bien souvent de prolonger l'hydrolyse au delà de deux heures. Il s'agit d'un facteur limitant pour la sensibilité de la méthode.

Afin d'améliorer cette sensibilité, nous avons étudié l'influence de l'addition de polyvinylpyrrolidone (PVP 30 000) et de sérum albumine bovine (BSA), dans les tampons d'extraction et de dilution (figure 2).

Dans le milieu d'extraction, l'addition de PVP (2 %) et de BSA (0,2 %) diminue sensiblement le bruit de fond enregistré avec les extraits bruts de canne saine mais n'a que peu d'influence sur les D.O. relatives aux extraits de cannes infectées (figure 2A). Bien que cela se traduise par des valeurs DO_{E-T} plus élevées, il semble néanmoins que la présence de PVP et de BSA dès l'extraction ait un effet défavorable sur le virus.

Lorsqu'on dilue l'extrait brut obtenu sans PVP ni BSA dans un milieu en contenant (figure 2B) on observe non seulement une baisse analogue du bruit de fond, mais aussi une augmentation assez nette des D.O. relatives aux extraits de plantes virosées. Dans ces conditions, le couplage des particules virales et des anticorps de revêtement semble être nettement favorisé, comme en témoignent les DO_{E-T} qui sont bien supérieures à celles obtenues en absence de PVP et de BSA ou même lorsqu'on les utilise dès l'extraction (figure 2C).

Dans l'exemple étudié, on remarque que les valeurs de D.O. obtenues avec les extraits dilués au 1/10 sont plus élevées que celles des mêmes extraits bruts. Ce comportement ne s'observe pas de façon régulière et n'est pas toujours aussi marqué, mais on note très souvent que le fait de diluer les extraits au 1/5 ou au 1/10 n'entraîne pas la diminution correspondante des D.O. que l'on pourrait attendre.

Par la suite, nous avons conservé pour l'extraction le tampon Tris-EDTA 0,05 M initial et pour la dilution éventuelle des extraits bruts, un tampon Tris-EDTA 0,005 M contenant 2 % de PVP et 0,2 % de BSA.

Au cours de l'hydrolyse, l'évolution des DO_{E-T} montre une forte croissance régulière jusqu'à 2 heures d'incubation, l'augmentation étant ensuite plus lente. En pratique, et pour des raisons de rapidité d'exécution du test on procède généralement à la lecture, une heure et demie après le dépôt du substrat.

COMPARAISON DU TEST ELISA ET DU CONTROLE VISUEL

Détection d'infections anciennes

L'extériorisation des symptômes sur la canne infectée par le virus de la Mosaïque dépend de nombreux facteurs liés au stade évolutif de l'infection et aux conditions de milieu.

Des essais préliminaires avaient montré que l'épreuve ELISA pouvait déceler la présence d'antigène viral dans des plants infectés ne présentant aucun symptôme au moment du test. Ceci a pu être confirmé lors d'un indexage réalisé en octobre 1980 sur un lot de «seedlings» qui avaient été inoculés 8 mois auparavant par la souche SCMV-D (tableau I). Lors de cet indexage, le test ELISA avait détecté 211 infections qui se répartissaient entre 95 infections fortes ($DO_{E-T} > 0,2$), 56 infections faibles ($0,1 < DO_{E-T} < 0,2$), et 60 cas douteux ($0,05 < DO_{E-T} < 0,1$). Au moment du test on ne pouvait observer des symptômes nets que sur 65 plants seulement.

L'épreuve immunoenzymatique avait donc permis de révéler 146 infections latentes (69 % des plantes indexées); ce chiffre particulièrement élevé s'explique vraisemblablement par les conditions de températures qui furent au cours de l'essai très défavorables à l'extériorisation de la Mosaïque.

* ng : nanogramme = 1×10^{-9} g.

L'analyse des concordances fait apparaître très logiquement que le pourcentage d'extériorisation décroît avec l'intensité de la réponse immunoenzymatique : 44 cas d'extériorisation pour 95 infections fortes (46,3 %) 12 pour 56 infections faibles (21,4 %) et seulement 9 pour 60 cas douteux (15 %). On remarque néanmoins que 51 plantes sans symptômes (dont 9 rétablies) contiennent des teneurs élevées en antigène viral (plus de la moitié des infections fortes sont latentes) ce qui ne permet pas d'établir une véritable corrélation entre la concentration en virus et l'extériorisation de la maladie.

Afin de savoir, si inversement, certaines plantes présentant des symptômes pouvaient échapper au test ELISA, un deuxième indexage, associé à un contrôle visuel a été pratiqué 6 mois plus tard sur 246 seedlings appartenant au même lot (tableau II). A cette époque, 82 cannes seulement montraient des symptômes; 67 d'entre elles des manifestations nettes et 15 des symptômes faibles ou douteux.

L'épreuve ELISA a détecté 165 infections dont 121 étaient nettes ($DO_{E-T} > 0,1$) et 44 douteuses. La supériorité du test sérologique est manifeste puisqu'il a permis de révéler 83 infections de plus que le contrôle visuel.

L'analyse des concordances précise cette supériorité : 89 plantes (53 réponses nettes et 36 cas douteux en ELISA) qui ne montrent aucun symptôme échappent par conséquent au contrôle visuel alors que 6 plantes seulement (dont 4 ne présentent que des symptômes faibles) ne sont pas détectées par le test ELISA.

Nous pouvons donc conclure que, **pour la détection d'infections anciennes**, l'indexage immunoenzymatique s'avère très supérieur à la seule observation des symptômes.

Détection d'infections récentes

Dans le cadre d'un programme de détection de clones résistant à la multiplication du virus de la Mosaïque, les «seedlings» issus de croisements polycross sont inoculés avec la souche SCMV-D et leur comportement étudié dans les premiers mois qui suivent l'inoculation. Il s'agit donc, dans ce cas, de comparer la validité de l'indexage sérologique avec celle du contrôle visuel actuellement pratiqué, basé sur l'extériorisation **d'infections récentes**.

Un essai portant sur 248 **seedlings**, représentés chacun par 4 à 6 cannes, soit un total de 642 plantes, a été conduit au début de 1981 dans des conditions très favorables à l'extériorisation des symptômes (tableau III).

CONTROLE VISUEL (OBSERVATION DES SYMPTOMES)

Dans cet essai, la précocité et l'intensité des symptômes ont varié considérablement selon les différents seedlings et même, dans une moindre mesure, selon les différentes cannes appartenant au même clone : 10 jours après l'inoculation, 154 plantes présentaient des symptômes nets et 8 autres des symptômes douteux, soit envi-

ron 65 % des plantes inoculées. Après 20 jours d'incubation, on notait 87 nouvelles plantes mosaïquées, dont il est vrai 24 ne montraient que des symptômes diffus et après un mois, 64 cas d'extériorisations tardives.

Outre cette grande variabilité dans la date d'apparition des symptômes, on remarquait également une certaine fluctuation dans leur extériorisation. Six semaines après l'inoculation, au moment où a eu lieu l'indexage ELISA, 373 plantes au total avaient extériorisé des symptômes nets ou diffus mais certaines d'entre elles étaient déjà apparemment rétablies. En fait, sur les 642 échantillons éprouvés, 355 soit 55,2 % présentaient une mosaïque à la date du test et parmi elles, 33 ne montraient que des symptômes diffus (tableau III, colonne 1).

INDEXAGE ELISA

Le test ELISA a détecté 356 infections certaines ($DO_{E-T} > 0,1$) dont 332 étaient des infections fortes; 29 échantillons étaient douteux et 257 ne réagissaient pas sérologiquement. Ces chiffres sont globalement légèrement supérieurs à ceux obtenus par le simple contrôle visuel : 336 infections certaines (322 avec symptômes plus 14 plantes rétablies) et 37 infections possibles ne se traduisant que par des symptômes douteux (33 au moment du test plus 4 plantes rétablies). Si l'on compare les résultats plante à plante obtenus avec les deux méthodes, on remarque tout d'abord qu'il y a concordance dans 550 cas : 317 infections certaines (297 infections fortes, 17 infections faibles 3 plantes rétablies), 2 infections douteuses et 231 plantes apparemment saines, soit 85,6 % des plantes indexées. Si l'on rassemble dans une même classe les individus infectés et douteux le pourcentage de concordance atteint même 90 %.

L'étude des cas de discordance permet de préciser les performances respectives des deux méthodes.

Au niveau des infections certaines, l'indexage sérologique permet de mettre en évidence la présence de l'antigène viral ($DO_{E-T} > 0,1$, colonne (2) et (3) du tableau III) dans 22 plantes n'extériorisant que des symptômes faibles au moment du test, dans 2 plantes rétablies et dans 15 plantes n'ayant jamais montré de symptômes (soit un total de 39 plantes).

Réciproquement, le contrôle visuel détecte 15 infections nettes (6 plantes avec symptômes et 9 plantes rétablies) qui échappent au contrôle ELISA (colonne 5) et 4 infections nettes (2 plantes avec symptômes et 2 plantes rétablies) qui restent douteuses en ELISA (colonne 4), soit un total de 19 plantes.

L'indexage immunoenzymatique apparaît donc plus fiable que la simple observation des symptômes.

L'analyse des cas douteux est plus délicate. On note que sur 37 plantes (33 au moment du test et 4 plantes rétablies) n'ayant extériorisé que des symptômes très faibles ou atypiques, 26 ont reçu grâce au test ELISA, la confirmation de leur infection (dont deux cas douteux seulement). D'autre part, si l'on abaisse le seuil de détec-

tion à 0,05 unité de D.O. au-dessus des témoins, l'épreuve ELISA détecte 29 infections supplémentaires (colonne 4). Parmi ces infections supposées, 4 seulement ont provoqué des symptômes forts et deux des manifestations diffuses.

DISCUSSION ET CONCLUSION

— L'apparition de symptômes foliaires sur la canne ne reflète que de façon très imparfaite les infections réelles par le virus de la Mosaïque. Nous avons souligné la grande variabilité dans la nature et l'intensité des manifestations observées dont certaines sont parfois si diffuses que le diagnostic visuel devient très difficile. Le nombre de ces cas «**douteux**» dépend évidemment du degré d'appréciation de l'observateur, mais il n'est jamais négligeable. Dans les tableaux II et III, on ne compte pas moins de 52 cas douteux pour 403 extériorisations nettes.

D'autre part, certaines infections peuvent, à un moment donné, n'occasionner sur la plante aucun symptôme apparent; ces **infections latentes** peuvent aussi bien être des infections précoces (apparition tardive des symptômes sur certains «seedlings» inoculés) que des infections anciennes qui ne se trouvent plus dans des conditions favorables à leur extériorisation (plantes apparemment rétablies).

Comparé au contrôle visuel, dont la fiabilité semble par conséquent très discutable, le test immunoenzymatique est susceptible d'apporter une solution satisfaisante au problème de la détection de ces infections **douteuses** ou **latentes**, puisqu'il se base uniquement sur la présence de l'antigène viral dans la plante infectée, indépendamment de l'extériorisation très fluctuante de la maladie.

En effet, la supériorité du test ELISA est apparue, non seulement de façon très évidente, dans le cas du premier essai (tableau I), réalisé dans des conditions défavorables à l'extériorisation de la Mosaïque, mais également lors du dernier essai (tableau III) alors que les conditions d'observation des symptômes étaient très bonnes; si les deux méthodes symptomatologique et sérologique ont alors fourni des résultats concordants pour plus de 85 % des échantillons, le test ELISA a néanmoins révélé davantage d'infections latentes que le contrôle visuel n'a détecté d'infection non reconnues en sérologie.

Ces résultats ne prennent en considération que les réactions nettes en ELISA pour lesquelles la DO_{E-T} est supérieure à 0,1. Il faut reconnaître que, dans nos conditions expérimentales, certains extraits de canne fournissent des valeurs de DO très peu supérieures à celles des extraits témoins de plante saine, ce qui nous a amenés à considérer une classe de «douteux», ayant une DO_{E-T} comprise entre 0,05 et 0,1. En l'absence d'un autre critère de détection plus sensible que le test ELISA, on ne peut pas affirmer que tous ces cas douteux correspon-

dent à des infections réelles. Mais s'il en était ainsi, l'épreuve immunoenzymatique serait encore bien plus performante que nous l'avons indiqué. Dans l'essai représenté sur le tableau III, le test ELISA détecterait 29 infections supplémentaires (colonne 4) dont 23 seraient latentes. Ajoutées aux 356 réactions fortes ou faibles (colonnes 2 et 3), cela ferait 385 infections révélées par sérologie, soit 93,6 % du total des infections supposées (les résultats des deux méthodes étant alors cumulés, cas douteux compris).

— L'intérêt majeur des méthodes immunoenzymatiques est leur très grande sensibilité. Appliqué au virus de la Mosaïque de la canne à sucre, le test ELISA peut détecter 1 ng/ml d'antigène SCMV-D purifié; il est donc environ 100 fois plus sensible que l'indexage biologique sur maïs. Des résultats analogues ont été obtenus par SUM et al. (1979) dans une étude comparée des méthodes de détection biologique et immunoenzymatique du MDMV-A. Le test ELISA est également bien plus performant que la méthode au latex, dont la sensibilité théorique n'atteint que 500 ng/ml (BAUDIN, 1977).

— Destiné à être utilisé pour l'indexage de routine d'un grand nombre d'échantillons, notamment lors du criblage de variétés résistantes, le test ELISA a également l'avantage d'être automatisable ce qui lui confère une rapidité et une facilité d'exécution incontestables. Dans nos conditions expérimentales, les résultats sont connus 8 heures après le dépôt des extraits et il est possible de traiter sans difficulté 400 échantillons dans la même journée; le test ayant lieu au laboratoire reste indépendant des variations saisonnières.

En fait, l'étape la plus longue reste le broyage individuel des échantillons bien que l'utilisation de micro-broyeurs bien adaptés ait sensiblement facilité la préparation des extraits. Dans une variante du test ELISA, les extraits de plantes sont remplacés par des disques de feuilles (ROMAINE et al., 1981). La méthode est ainsi plus rapide, mais perd en sensibilité, à moins que l'on prolonge l'incubation du substrat. Il ne semble pas que cette technique simplifiée puisse détecter les infections latentes qui, dans les extraits de canne obtenus par broyage ne donnent que des valeurs de D.O. très faibles.

— Comme le test ELISA, l'indexage biologique sur maïs nécessite également des broyages pour la préparation des inoculum; mais cet indexage est par la suite beaucoup plus laborieux que l'épreuve sérologique. L'élevage de nombreuses plantes-tests (jusqu'à 20 plantes par échantillon), leur inoculation et une longue période d'incubation en serre avant que les symptômes apparaissent, demandent entre 3 à 5 semaines. Par ailleurs, la réponse des plantes inoculées est tributaire des conditions climatiques du moment. Enfin, le test biologique est bien plus coûteux car grand consommateur d'énergie. Son seul intérêt réside dans le fait que l'on s'adresse directement au pouvoir infectieux du virus présent dans la plante infectée, ce qui peut sembler a priori plus satisfaisant pour le pathologiste.

— La détection par la méthode ELISA d'un antigène viral qui n'est pas obligatoirement lié au génôme infectieux du virus, n'en traduit pas moins la multiplication de celui-ci dans le végétal éprouvé : non seulement il s'agit de la méthode la plus sensible pour la reconnaissance des infections naturelles, mais de plus elle peut apporter des données indispensables pour l'étude du déroulement de la maladie dans une plante expérimentalement infectée.

En effet, c'est en comparant l'évolution de la teneur en antigène viral avec la mise en évidence du virus soit par son pouvoir infectieux, soit par l'apparition des symptômes, que l'on pourra déterminer la période la plus propice pour procéder au test ELISA : celle qui, après l'inoculation, permettra de mieux rendre compte des différences de comportement des seedlings, vis-à-vis de l'infection par le SCMV-D et de juger de leur résistance relative à la multiplication du virus.

Références bibliographiques

- AVRAMEAS S. — 1969 : Coupling of enzymes to proteins with glutaraldehyde **Immunochemistry** 6. (43-52).
- BAUDIN P. — 1977 : Etude d'une souche du virus de la Mosaïque de la canne à sucre. **L'Agronomie Tropicale** XXXII, (180-204).
- BAUDIN P. & VUITTENEZ A. — 1972 : Application de la méthode au latex de BERKS au diagnostic du virus de la Mosaïque de la canne à sucre. **C.R. Soc. Biol.** 166 (491-494).
- CLARK MF. & ADAMS A.N. — 1977 : Characteristics of the microplate method of enzyme linked immunosorbent assay for detection of plant virus. **J. Gen. Virol.** 34 (46-53).
- GONZALEZ RIOS P. & ADSUAR J. — 1953 : Effect of Mosaic on the yields of sugar cane variety B 34104. **J. Agr. Univ. Puerto Rico** 37 (1) (13-18).
- LANGENBERG W.G. — 1973 : Serology, physical properties and purification of unaggregated infectious Maize Dwarf Mosaic Virus; **Phytopathology** 63 (149-154).
- ROMAINE C.P., Susan R. NEWHART & ANZOLA D. — 1981 : Enzyme linked immunosorbent assay for plant viruses in intact leaf tissue discs. **Phytopathology** 71 (308-311).
- SUM I, Maria NEMETH & PACSA A.S. — 1979 : Detection of Maize Dwarf Mosaic Virus with enzyme linked immunosorbent assay (ELISA) **Phytopathology** 69 (274-278).
- WAGNER G.W. & DALE J.L. — 1966 : A serological comparison of Maize Dwarf Mosaic Virus isolates. **Phytopathology** 56 (1422 - 1433).

Tableau I
DETECTION IMMUNOENZYMATIQUE DES INFECTIONS LATENTES

(Essai réalisé en octobre 1980 sur des seedlings inoculés depuis 7 à 9 mois par la souche SCMV-D)

Contrôle visuel	Indexage immunoenzymatique E.L.I.S.A.		
	Réaction forte $DO_{E-T} > 0,2$	Réaction faible $0,1 < DO_{E-T} < 0,2$	Réaction douteuse $0,05 < DO_{E-T} < 0,1$
Plantes montrant des symptômes au moment du test 65	44	12	9
Plantes rétablies au moment du test 15			
Plantes n'ayant jamais montré de symptômes 131	42	42	47
Totaux 211	95	56	60
	151		

Tableau II
COMPARAISON DU CONTROLE VISUEL ET DE L'EPREUVE ELISA POUR LA DETECTION DU VIRUS
DE LA MOSAIQUE DE LA CANNE A SUCRE (SCMV-D)

(Essai réalisé en janvier 1981 sur des «seedlings» inoculés depuis 14 mois)

Contrôle visuel		Indexage immunoenzymatique E.L.I.S.A.			
		Réaction nette $DO_{E-T} > 0,1$	Réaction douteuse $0,05 < DO_{E-T} < 0,1$	Pas de réaction $DO_{E-T} < 0,05$	
Symptômes nets	67	} 82	61	4	2
Symptômes douteux.....	15		7	4	4
Pas de symptômes.....	164		53	36	75
Totaux	246		121	44	81
			165		

Tableau III
DETECTION IMMUNOENZYMATIQUE DES INFECTIONS RECENTES PAR LE VIRUS DE LA MOSAIQUE
DE LA CANNE A SUCRE (SCMV-D)

Contrôle visuel			Indexage immunoenzymatique ELISA			
			Réaction forte $DO_{E-T} > 0,2$	Réaction faible $0,1 < DO_{E-T} < 0,2$	Réaction douteuse $0,05 < DO_{E-T} < 0,1$	Pas de réaction
Symptômes observés au moment du test	Fort	(1) 322	(2) 297	(3) 17	(4) 2	(5) 6
	Douteux	355 } 33	22	—	2	9
Symptômes observés avant le test (plantes rétablies)	Fort	18 } 14	3	—	2	9
	Douteux	4	1	1	—	2
Plantes n'ayant jamais montré de symptômes		269	9	6	23	231
Totaux		642	332	24	29	257
			356			

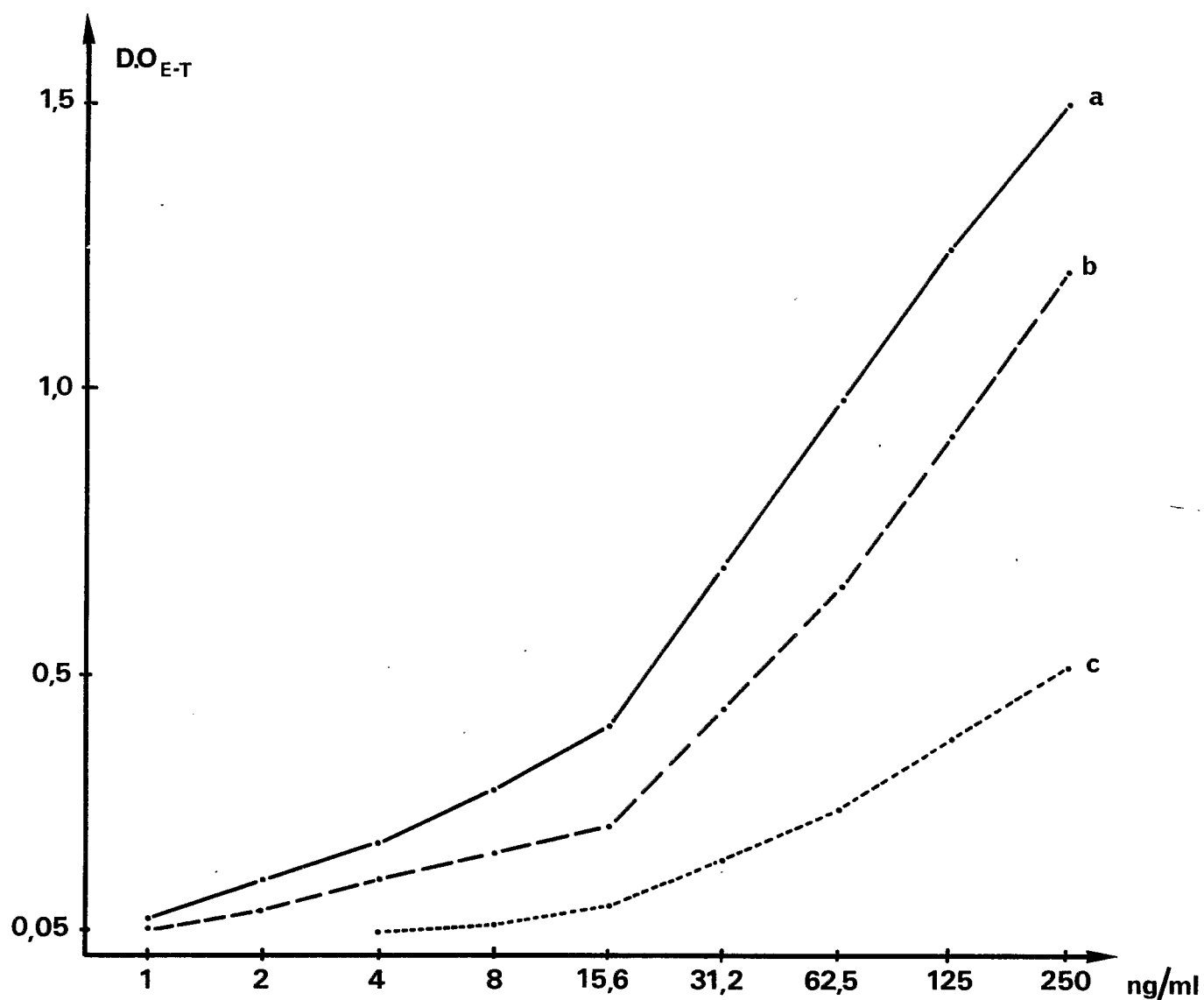


Figure 1 :

Détection immunoenzymatique du SCMV-D dans des extraits purifiés : Sensibilité de la méthode.
Durée d'incubation du substrat (p-nitrophénylphosphate 0,7 mg/ml dans un tampon diéthanolamine pH 9,8) : 30,60 et 90 minutes (moyenne de 10 lectures par échantillon).

c)----- 30 mn; b) -.-.-. 60 mn; a)——— 90 mn.

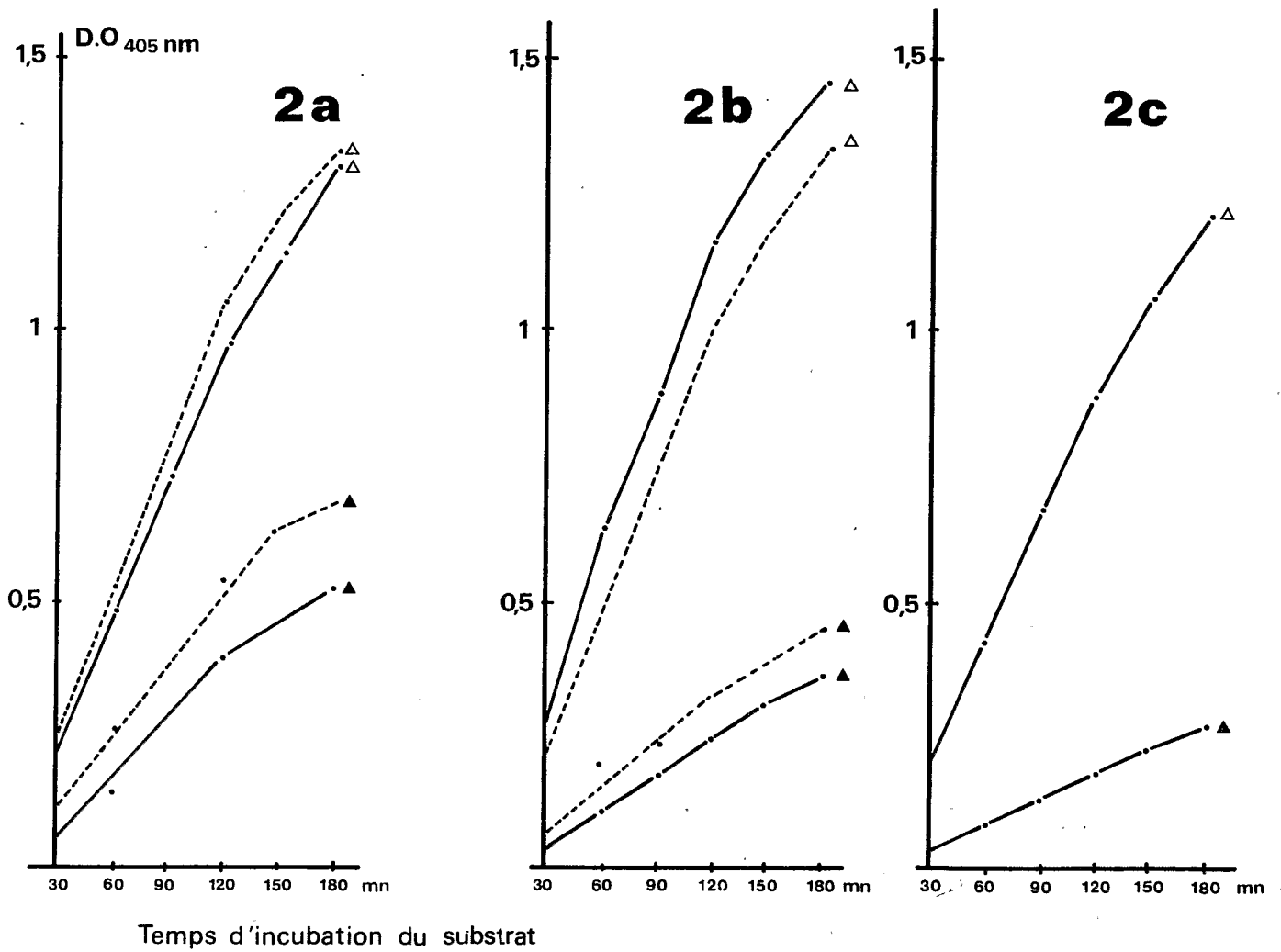


Figure 2 :

Détection immunoenzymatique du SCMV-D dans des extraits de canne. Influence de l'addition de PVP (2 %) et de BSA (0,2 %) dans les tampons d'extraction (Tris-EDTA 0,05 M) ou de dilution (Tris-EDTA 0,005 M).

(▲) canne saine (△) canne infectée

2 a - extraits «bruts» (1 g/8 ml)

tampon d'extraction ---- sans PVP + BSA
 — avec

2 b - extraits dilués au 1/10

tampon d'extraction ---- sans PVP + BSA
 — avec

2 c - extraits dilués au 1/10

(——) tampon d'extraction et de dilution avec PVP + BSA



Figure 3 :
Symptômes de Mosaïque sur canne à sucre, variété B 46364