

## ETUDE D'UN VIRUS BACILLIFORME DU MANIOC

Compte-rendu du travail effectué au Département de Virologie du Scottish  
Crop Research Institute du 11 janvier au 11 novembre 1988

Denis Fargette

Novembre 1988

Fonds Documentaire IRD



010022742

Fonds Documentaire IRD

Cote : Bx 22742 Ex: *unique*

## INTRODUCTION

Préambule. Des trois sujets initialement proposés dans sa lettre d'accueil, M. Harrison a finalement retenu l'étude d'un virus du manioc récemment isolé. Ce choix se justifiait par:

--- l'intérêt scientifique du virus: les résultats préliminaires suggéraient que nous étions en présence d'un virus inconnu jusqu'à présent et qu'il s'agissait peut-être du premier représentant d'un groupe nouveau.

--- l'importance économique du problème: sans préjuger de l'ampleur des pertes provoquées, l'agent pathogène de la maladie doit être identifié si l'on veut ensuite, par un contrôle phytosanitaire basé sur des tests sérologiques, éviter une diffusion accidentelle du virus lors du transfert de matériel végétal d'un pays ou d'un continent à l'autre.

--- par l'origine du virus: le virus provient de Côte d'Ivoire. Il a été isolé au SCRI à l'occasion de l'étude exhaustive des souches de la Mosaïque africaine du manioc de Côte d'Ivoire, travail mené en collaboration entre le laboratoire de Virologie d'Adiopodoumé et le département de Virologie du SCRI.

Objet du document. Ce texte n'a pas été écrit dans l'esprit d'une publication. Il s'agit plutôt d'un compte-rendu "au jour le jour" du travail accompli. Il décrit la méthode appliquée, les résultats obtenus, les difficultés rencontrées et la façon dont elles ont été surmontées. Nous avons débuté notre travail par l'étude des propriétés biologiques du virus, puis nous avons procédé à la mise au point de la méthode de purification. Celle-ci achevée, nous avons entamé l'étude des propriétés sérologiques (mise au point d'un sérum et de tests sérologiques) et biochimiques (caractérisation de la protéine, de l'acide nucléique ...).

## RESULTATS

Résultats préliminaires. Les tests réalisés avant mon arrivée au SCRI ont mis en évidence les résultats suivants:

--- le virus est transmissible mécaniquement

--- *Chenopodium murale* est un hôte "diagnostic"

plusieurs traitements. La comparaison se fait, suivant l'étape, par une ou plusieurs des techniques suivantes:

--- Par comparaison du pouvoir infectieux des extraits et des préparations. Elle est réalisée sur l'hôte "diagnostic" (*C. murale*) avec répartition des traitements suivant un dispositif en carré latin, puis comptage de lésions et enfin analyse des résultats par analyse de variance

--- Par comparaison de la sensibilité des souches

Thioglycerol (1%), Mercaptoéthanol (1%), Dithiotreitol (0,15%). Aucun additif ne s'est avéré utile lors de l'extraction.

#### Clarification.

--- Clarification (Chloroforme, Chloroforme-butanol, Butanol).

A ce stade, les observations en microscopie électronique ont montré que le nombre de particules contenues dans les extraits de plantes infectées avec la souche "faible" était très limité. En revanche, l'extraction selon la même méthode à partir de plantes infectées avec la souche "forte" révélait, toujours par microscopie électronique, la présence d'un nombre élevé de particules. La souche "faible" a donc été abandonnée et nous avons porté nos efforts sur la souche "forte".

#### Concentration.

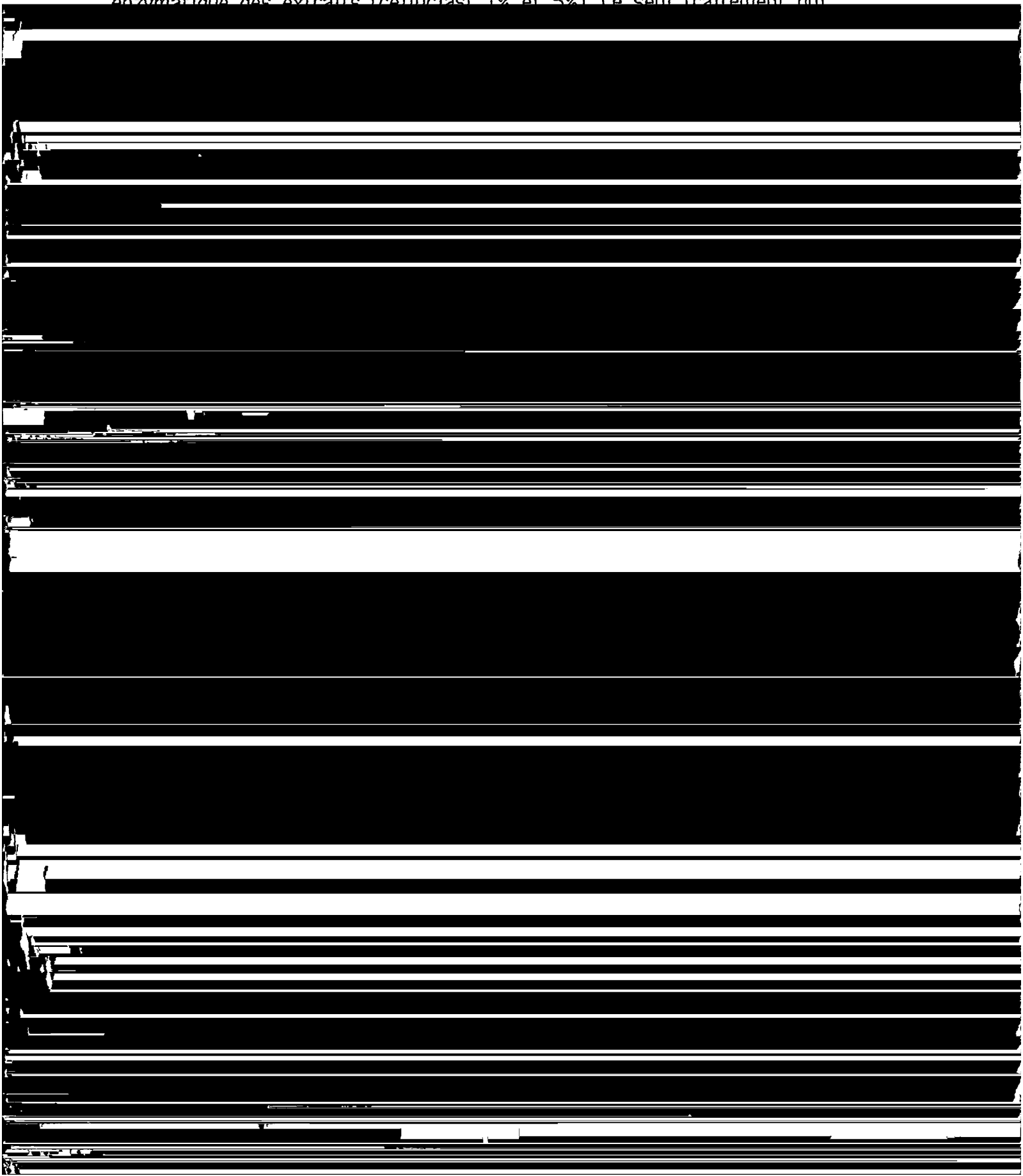
--- Concentration avec polyéthylène glycol : PEG 4%, PEG 6%, PEG 8% avec 0.2 M NaCl.

--- Concentration par une série de centrifugation différentielle; resuspension dans le tampon d'extraction dilué 5 fois; puis séparation par gradient de saccharose 10-40%.

L'observation au microscope électronique des préparations montrait alors une grande quantité d'impuretés et particulièrement de ferritines. Un ajustement du temps de centrifugation nécessaire (à partir des coefficients de sédimentation de l'Alfalfa mosaic virus) et une seconde série de centrifugation différentielle ont permis de se débarrasser des ferritines.

--- La concentration en virus restait cependant insuffisante pour pouvoir être détectée à "l'ISCO". Les méthodes d'extraction ont donc été reprises à l'aide de nouveaux procédés physiques et chimiques

--- Broyage mécanique ("waring blendor"), extraction "à la main" avec ou sans ajout d'azote liquide (extrait réduit en poudre) ou par traitement enzymatique des extraits (celluclast 1% et 5%). Le seul traitement qui



clarification et de concentration étaient effectivement optimisées. En revanche, des pertes importantes de virus avaient lieu au cours des phases de resuspension. Nous avons alors entièrement repris les méthodes de resuspension, travail fastidieux et long, car seul un petit nombre de traitements peut-être comparé simultanément et chaque comparaison exige que la purification soit menée jusqu'à son terme.

--- Borate (0,05 M) pH 6,5; Phosphate 7. Aucun traitement satisfaisant

--- Borate (0,05 M) pH 6,5; Phosphate pH 6,5; Citrate pH 6,5. Aucun traitement satisfaisant. Cependant, la resuspension dans le tampon phosphate s'avérait la plus efficace pour l'élimination des impuretés.

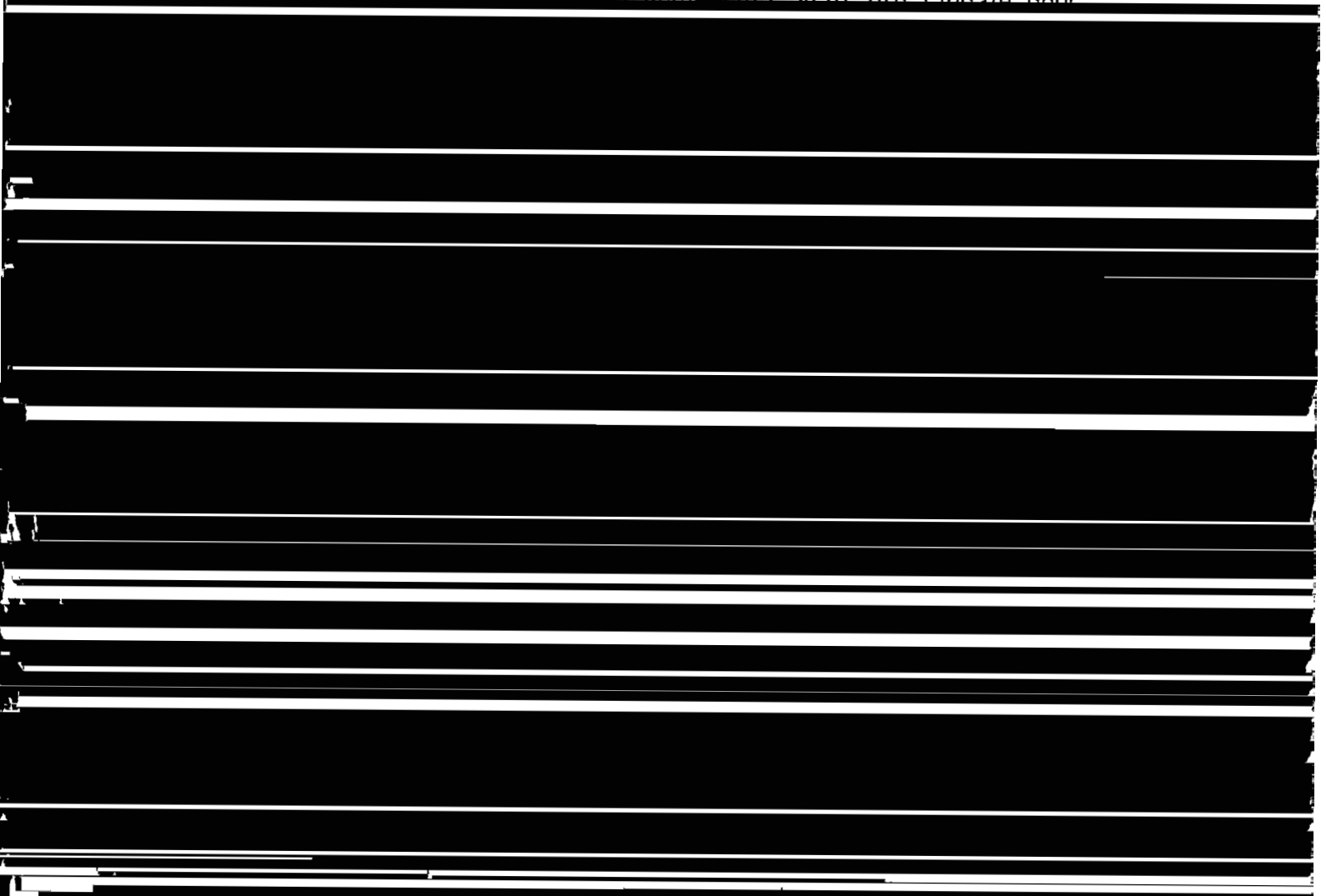
--- A ce stade, nous avons cherché à "optimiser" le matériel végétal. La date de récolte des plantes infectées s'avère déterminante. La

concentration de virus se trouvait en effet bien supérieure avec du

--- Phosphate (pH 5,8): 0,025 M, 0,05 M et 0,1 M. Les résultats étaient équivalents aux deux molarités les plus fortes. Le troisième pic se distinguait alors nettement. La pureté de la préparation était suffisante



Si la méthode de purification semblait alors optimisée (état et nombre des particules, propreté des préparations, pertes limitées à chacune des étapes), le rendement total en virus restait toujours faible et inférieur à 1 mg de virus par kilogramme de plante récoltée. Nous avons alors porté à 200 environ le nombre de plantes récoltées et appliqué la même méthode de purification. La concentration de virus obtenue était alors satisfaisante mais la quantité de matériel de plante dans la préparation se trouvait alors à nouveau anormalement élevée. Nous avons attribué ce résultat à une modification du pH du tampon de resuspension liée à la présence d'une trop grande quantité d'extrait de plante par unité de volume de tampon. Nous avons repris la méthode en portant la molarité du tampon de resuspension à 0,1 M et en testant l'effet de l'EDTA pour mieux préserver le pouvoir infectieux des extraits (comme cela avait été signalé pour



6% NaCl 0,2M pendant 2 h à 5°C. Le précipité est recueilli après C.B.V. puis resuspendu pendant la nuit à 5°C dans du tampon phosphate 0,1 M pH 5,8 avec 0,002 M EDTA. Le surnageant est récupéré après C.B.V. puis est concentré par centrifugation pendant 45 mn à 370000 g. Le culot est resuspendu dans le même tampon dit de "resuspension" à 5°C durant la nuit. Le surnageant est récupéré après C.B.V., déposé sur un gradient de saccharose 10-40% et centrifugé à 275000 g pendant 1 h. Le gradient est analysé par spectrophotométrie d'absorption UV à 254 nm, les fractions contenant le virus sont récoltées et centrifugées 90 mn à 370000g. Le culot est resuspendu dans 1 ml du tampon de resuspension. Le surnageant est récupéré après C.B.V.

#### Propriétés physiques. (spectre du virus)

$A_{260}/A_{280} = 1,65 \pm 0,05$ .

$A_{\max}/A_{\min} = 1,25 \pm 0,05$

#### Sérologie.

Le virus est fixé avant injection par ajout de glutaraldehyde (0,5%). Trois injections en intra-musculaires à deux semaines d'intervalle ont eu lieu (respectivement 200, 150 et 300 µg de virus). Ces injections seront poursuivies et le titre du sérum obtenu sera prochainement évalué. La mise au point d'un test ELISA est prévue.

#### Propriétés biochimiques.

Masse moléculaire de la protéine capsidaire (par électrophorèse sur gel de polyacrylamide avec tampon discontinu) : 22000 (résultat à confirmer avec d'autres concentrations de polyacrylamide).

## CONCLUSION

Ce virus s'est avéré difficile à purifier. Présent en quantité très faible dans la plante, difficilement soluble, rapidement dégradé, contaminé par les composants de la plante, de nombreuses "manip" ont été nécessaires. Un matériel de centrifugation performant et l'appui, à toutes les étapes, d'un microscope électronique ont été essentiels aussi à la réussite du travail.

Grâce à la méthode de purification mise au point nous sommes maintenant en mesure d'extraire le virus en quantité suffisante et indemne de contaminants de plante. Le principal "goulot d'étranglement" du travail est ainsi levé. Il nous faut maintenant achever les études sérologiques et biochimiques et tout particulièrement celle des acides nucléiques, phase à la fois décisive et délicate. Il nous faudra aussi compléter et confirmer certains des résultats acquis (par exemple la transmission par d'autres vecteurs.) Une fois le travail terminé il nous faudra évidemment

présenter, sous forme de publication, les résultats acquis.

Les résultats, bien qu'incomplets, sont suffisants pour montrer l'originalité du virus auquel nous avons affaire. Il s'agit, à l'évidence d'un virus nouveau. Son statut reste encore à définir. Il est apparemment proche de l'Alfalfa mosaic virus: il s'agit en effet d'un virus à composants multiples d'aspect bacilliforme et dont les propriétés biochimiques sont

sphériques. Enfin, jusqu'à présent, nous n'avons pu le transmettre par aphides. L'étude des acides nucléiques sera décisive. Selon les résultats