

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"
- *Chenopodium quinoa* est un hôte de multiplication possible.
- Il existe au moins deux souches du virus: une souche "forte" caractérisée par des symptômes de flétrissement et de nécrose et une souche "faible" qui infecte *C. quinoa* sans provoquer de symptômes.
- Des particules bacilliformes ont été observées au microscope électronique dans des extraits de plants de *C. quinoa* infectés.
- Aucune réaction sérologique n'a été détectée avec d'autres virus bacilliformes et en particulier avec l'Alfalfa mosaic virus, virus qui semble morphologiquement le plus proche.

Propriétés biologiques. La gamme d'hôte, identique pour les deux souches, comprend des espèces des familles des Chénopodiacées, des Composées, des Amaranthacées, des Solanacées, des Aizoaceanées et des Légumineuses. La plupart des plantes infectées n'extériorisent pas de symptômes. La température d'inactivation est de 55°C et la dilution limite de 10^{-4} . A température ambiante, le pouvoir infectieux disparaît après deux ou trois jours. Le virus n'est pas transmis par *Myzus persicae*, ni sur le mode persistant ni sur le mode non persistant.

Mise au point de la méthode de purification. La mise au point de la méthode de purification passe par la comparaison, pour chaque phase (extraction, clarification, concentration) et au cours de chacune des étapes, de

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 après transformation logarithmique des variables.

--- Par observation au microscope électronique des particules virales contenues dans les préparations (leaf dip). Utilisé systématiquement dès la phase de clarification, ce procédé apporte des informations sur le nombre et l'état des particules virales, sur la pureté des préparations et sur la présence possible d'autres virus contaminants.

--- Par analyse des gradients par spectrophotométrie d'absorption ISCO à 254 nm. Cette technique renseigne sur le nombre de particules, la quantité d'acide nucléique viral et la pureté de la préparation.

Extraction. Initialement, la souche retenue pour l'étude a été la souche "faible". On craignait en effet que la souche "forte", qui réduit considérablement la croissance de la plante, ne permette pas une multiplication suffisante du virus. Pour la mise au point du processus d'extraction, ont été testés successivement, sur extrait de plante frais puis sur extraits âgés de 3 jours, des tampons différents par leurs ions, le pH, la molarité, et les additifs. Le traitement le plus efficace retenu pour l'étape suivante est souligné.

--- Tampon d'extraction : borate, citrate, phosphate, Tris/HCL

--- le pH : 6,5; 7; 8; 8,5.

--- La molarité : 0.025; 0,05; 0,1; 0,2.

--- Les additifs : EDTA (0,005 M) EDTA (0,01M), DIECA (0,01M),

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 blender"), 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 augmentait significativement le rendement était la réextraction des fibres par broyage mécanique.

La phase d'extraction du virus semblait alors optimisée. Nous avons ensuite porté notre attention sur la resuspension.

--- Resuspension: tampon à pH 6,5, 8,5 avec ou sans Triton 1%, celluclast 2%.

Seule la diminution du pH de 8,5 à 6,5 donnait des résultats encourageants. Nous obtenions à "l'ISCO" une trace présentant quatre pics. Cependant, la position des premiers pics suggérait la présence de matériel de plante. La comparaison avec des préparations "témoins" de matériel sain a montré que les deux premiers pics étaient effectivement liés à la présence d'extraits de plante dans la préparation, mais que les deux pics suivants étaient bien dus au virus. Nous étions donc en présence d'un virus ayant au moins deux composants. La microscopie électronique confirmait la présence de particules bacilliformes de taille différente. Nous avons atteint ce stade des travaux en juillet.

Deux problèmes restaient à résoudre avant d'entamer l'étude sérologique et biochimique. D'une part, la hauteur des pics de virus montrait que la concentration en particules était toujours insuffisante. D'autre part, le deuxième pic de composant de plante était trop proche du premier pic de virus pour en être entièrement séparé à l'issue du gradient de saccharose. Nous avons alors estimé l'efficacité de chacune des étapes. L'analyse, par évaluation du pouvoir infectieux de tous les extraits (ceux conservés et ceux éliminés), a montré que les phases d'extraction, de

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 matériel végétal récolté 5-6 jours après l'inoculation que passée cette date. En revanche l'âge du matériel lors de l'inoculation ne semblait pas décisif: des quantités de virus comparables ont été obtenues avec des plantes âgées de 4, 5 et 6 semaines lors de l'inoculation.

--- phosphate (0,05M) pH 6,5; 7 et 7,5. Les résultats obtenus au pH le plus bas, bien qu'encore insuffisants, étaient encourageants. Ce résultat était confirmé lors de la purification ultérieure dans laquelle la quantité de matériel végétal est augmenté. Il apparaissait alors que le premier pic de virus était en fait constitué de deux pics très proches. Le virus s'avérait donc composé non pas de deux mais d'au moins trois composants. Le pH semblait le paramètre clé contrôlant l'élimination du matériel végétal et la mise en resuspension du virus. Nous avons poursuivi les expériences en testant l'effet de différents tampons de resuspension dont le pH étant de plus en plus bas.

--- Phosphate (0,05M) pH 5,8; 6,2; 6,5. Le pH le plus bas donnait les meilleurs résultats. Nous avons testé alors plusieurs molarités.

--- 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 pour se passer de la seconde série de centrifugation différentielle.

---Phosphate (0,05M:) 5,5; 5,8; 6,0. Les résultats étaient équivalents aux deux pH les plus bas. Le tampon de resuspension semblait à son tour "optimisé" (pH, molarité). Une nouvelle évaluation du pouvoir infectieux des fractions éliminées confirmait que les pertes de virus au cours de la phase de resuspension étaient effectivement beaucoup plus faibles.

Les préparations étaient alors suffisamment concentrées en particules virales pour permettre des photos satisfaisantes en microscopie électronique. L'histogramme des longueurs a été établi à partir des mesures prises sur un millier de particules environ afin d'obtenir une discrimination des particules de différentes tailles. Il s'avérait que nous avions affaire à un virus ayant au moins 3 composants de taille respective 40, 50 et 80 nm, chacun des composants étant de type bacilliforme. On observait aussi, lors de l'analyse des gradients de préparation suffisamment concentrées, un "épaulement" après le troisième pic, suggérant la présence d'un quatrième composant de virus en plus faible quantité. Le troisième composant étant nettement plus long que tous ceux de l'Alfalfa mosaic, il s'agissait bien d'un virus nouveau. Nous avons alors testé les relations de ce virus du manioc avec un autre virus bacilliforme à composants multiples, récemment isolé à partir de l'olivier et lui aussi distinct de l'Alfalfa mosaic virus. Aucune relation n'a été mise en évidence au microscope électronique avec le sérum de ce virus, ni par les techniques de "trapping" ni par celles de "décoration".

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 l'Alfalfa mosaic virus).

--- phosphate 0,1 M, EDTA 0,001 M; EDTA 0,002 M. L'augmentation de la molarité et l'ajout d'EDTA donnaient des résultats qui sont maintenant jugés suffisants pour aborder les études sérologiques et biochimiques. La purification suivante, menée elle aussi à partir de 200 plantes, confirmait que la méthode de purification était satisfaisante. Nous avons atteint ce stade du travail en octobre.

Résumé de la méthode de purification retenue. Les feuilles terminales de 200 plants environ de *Chenopodium quinoa* sont récoltées 5 à 6 jours après inoculation. Le matériel est broyé à l'aide d'un "waring blender" dans du tampon borate 0,05 M pH 8,5 à raison de 1g de feuille pour 4 ml de tampon. Les fibres sont ré-extraites dans le même tampon. La préparation est alors clarifiée par ajout de chloroforme (1 vol de chloroforme/2 vol d'extrait), puis l'émulsion est brisée par Centrifugation à Basse Vitesse (C.B.V.), 10 mn à 10000g. Le surnageant est récolté, puis on ajoute du PEG

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 dont nous disposons sont voisines (taux d'acide nucléique, poids de la protéine capsidaire). Ce virus du manioc est cependant, sans ambiguïté, distinct de l'Alfalfa mosaic virus. Il ne lui est pas relié sérologiquement. En outre, l'un des composants de ce virus a des particules plus longues que celles de l'Alfalfa mosaic virus. En revanche, il ne semble y avoir de particules

sphériques. Enfin, jusqu'à présent, nous n'avons pu le transmettre par aphides. L'étude des acides nucléiques sera décisive. Selon les résultats, on pourra décider si l'on a affaire au second membre du virus du groupe de l'Alfalfa mosaic (à condition de revoir la définition du groupe) ou s'il s'agit du premier représentant d'un groupe nouveau. Pour connaître complètement ce nouveau virus du manioc, pour décider de son statut, cette étude doit donc être achevée.