

Diagnostic d'infection à geminivirus à l'aide d'anticorps monoclonaux dirigés contre le virus de la mosaïque africaine du manioc

par

L. GIVORD (*), D. FARGETTE (**), B. KOUNOUNGUSSA (***),
J.C. THOUVENEL (****), M.H.V. VAN REGENMORTEL (*)

Résumé

L'objectif du travail consiste en la mise au point d'un test de diagnostic du virus de la mosaïque du manioc, utilisable à grande échelle sur le continent africain. Dans ce but, des anticorps monoclonaux ont été produits par fusion de lymphocytes de souris immunisées contre une souche africaine du virus de la mosaïque du manioc (ACMV) et testés pour leur utilisation en DAS-ELISA. Certains des anticorps monoclonaux sélectionnés permettent la détection de l'ensemble des souches d'ACMV, ainsi que d'autres geminivirus. Un test DAS-ELISA utilisant deux anticorps monoclonaux a été optimisé en vue de son utilisation routinière pour la détection de l'ACMV et du "tomato yellow leaf curl virus" au Sénégal.

(*) Immunochimie. Institut de Biologie Moléculaire et Cellulaire du CNRS (IBMC). Rue Descartes, 15. F-67084 STRASBOURG Cédex (France).

(**) Scottish Crop Research Institute (SCRI). Invergowrie. DUNDEE DD2 5DA (United Kingdom).

(***) Institut National de la Recherche Agronomique (INRA). BP 507. F-68021 COLMAR (France).

(****) ORSTOM. Midan Ibn Afan 13. Dokki Cairo (Egypte).

Communication présentée lors du Symposium "Phytopathologie et Biologie moléculaire" organisé par le professeur J. SEMAL et qui eut lieu du 29 juin au 3 juillet 1992, à la Faculté des Sciences Agronomiques de Gembloux.

1. Introduction

Le manioc, plante pérenne originaire d'Amérique du Sud, a été introduit par les Portugais en Afrique vers la fin du 16^e siècle. C'est la première grande culture vivrière dans de nombreux pays d'Afrique ; dans les autres, il suit immédiatement le sorgho, l'igname ou le riz. Il s'agit d'une plante rustique qui se reproduit par bouturage et donne au bout de 12 mois un faisceau d'énormes tubercules pesant chacun en moyenne 3 kg. Le grand avantage de cette culture est que les tubercules peuvent n'être récoltés qu'au bout de 18 à 24 mois, mettant ainsi à l'abri des dures périodes de soudure que connaissent bien les populations qui se nourrissent de céréales. La racine de manioc est un aliment essentiellement énergétique ; les feuilles, beaucoup plus riches en nutriments, sont consommées à la façon des épinards.

Le manioc est attaqué par plusieurs insectes, champignons ou virus, mais on ne lui connaît qu'une seule espèce d'acarien prédateur et une seule bactériose phytopathogène. En Afrique, la mosaïque du manioc causée par un virus, en est la maladie la plus répandue et la plus importante (Photo 1). Elle provoque des pertes de rendement de 20 à 80 % et revient régulièrement chaque saison. Ceci s'explique par le fait que le virus responsable est disséminé en même temps que la plante par la reproduction végétative et parce qu'il est, de plus, transmis par un Aleurodidae, *Bemisia tabaci* GEN. qui pullule en début de saison des pluies, période la plus favorable pour la plantation du manioc.

La maladie, décrite pour la première fois en 1894 par WARBURG, a pu être transmise à des plantes saines par voie mécanique par BOCK et GUTHRIE, en Afrique de l'Est, en 1978. Le "cassava latent virus", nommé par la suite "African Cassava Mosaic Virus (ACMV)", décrit en tant que geminivirus, a fait l'objet d'un certain nombre d'études relatives à sa transmission par insecte, sa purification, son épidémiologie, la constitution et l'organisation de son ADN génomique, ainsi qu'à son diagnostic. Les études se rapportant directement à notre propos, c'est-à-dire le diagnostic de geminivirus à l'aide de tests immunoenzymatiques, sont les suivantes : d'une part, celles de SEQUEIRA et HARRISON [1982], THOUVENEL *et al.* [1984], FARGETTE *et al.* [1987] et KOUNOUNGUSSA *et al.* [1989], qui résultent de l'utilisation des anticorps polyclonaux et d'autre part, celles de THOMAS *et al.* [1986], HARRISON *et al.* [1991] et MUNIYAPPA *et al.* [1991] qui concernent l'usage des anticorps monoclonaux (AcMc).

Dans le cadre du programme de l'ORSTOM pour l'éradication de ACMV, notre objectif concerne la mise au point d'un test de diagnostic à grande échelle, utilisable sur le continent africain.

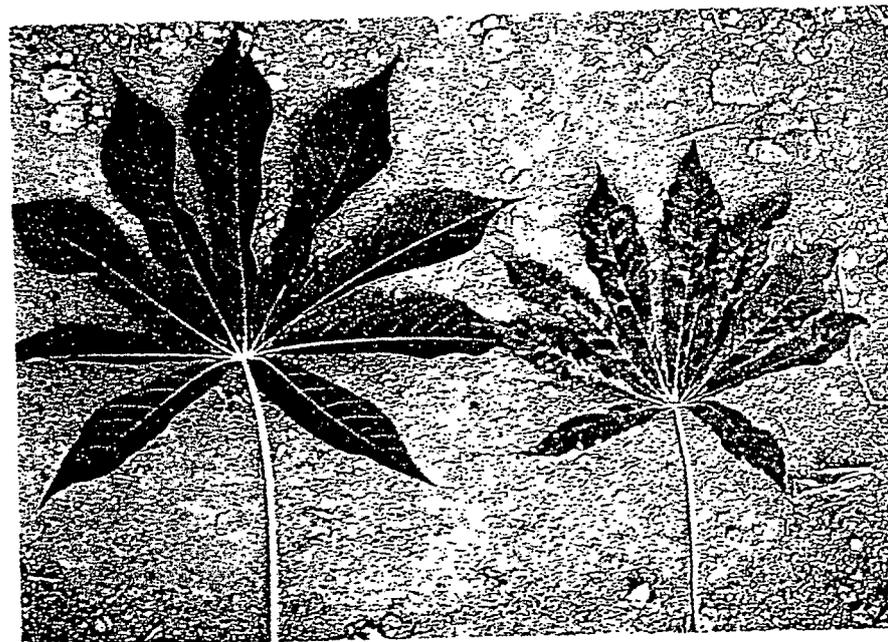


Photo 1. — Feuille de manioc : saine (gauche) et infectée par le virus de la mosaïque africaine du manioc (droite).
Leaf of Cassava : healthy (left) and infected by African cassava mosaic virus (right).

Les tests élaborés précédemment par notre groupe, en Côte-d'Ivoire et en France [THOUVENEL *et al.*, 1984 ; FARGETTE *et al.*, 1987 ; KOUNOUNGUSSA *et al.*, 1989], ne sont pas adaptés à ce type de besoin, car ils sont tous basés sur l'usage des anticorps polyclonaux.

En 1986, THOMAS *et al.* du SCRI de Dundee (Ecosse) ont produit des AcMc dirigés contre une souche ACMV-J1, originaire d'Afrique de l'Est. Nous avons utilisé la même méthodologie, en recherchant des AcMc susceptibles de reconnaître un maximum de souches ou d'isolats viraux d'origines diverses.

2. Matériels et méthodes

Les AcMc ont été produits par fusion de lymphocytes de souris BALB/c, immunisées contre l'ACMV (souche TMS 30211, IITA, Nigeria),

avec des cellules myéломateuses PAI [STOCKER *et al.*, 1982]. Le milieu de culture des hybridomes est additionné de macrophages ; la sélection a été faite par dilution limite en phase liquide, par deux sous-clonages successifs. La présence d'AcMc dans les surnageants de culture a été testée simultanément par des tests ACP (Antigen Coated Plate) et DAS (Double Antibody Sandwich) ELISA. En ACP-ELISA, le virus purifié est directement fixé au polystyrène des plaques de microtitration et constitue donc la première couche du test, tandis qu'en DAS-ELISA, le virus est capté par des immunoglobulines G (IgG) de lapin, spécifiques de l'ACMV. Dans les deux cas, l'antigène est ensuite reconnu par un AcMc spécifique, lui-même mis en évidence à l'aide d'un anticorps anti-IgG de souris, conjugué à la phosphatase alcaline. Les hybridomes stables sélectionnés ont été reproduits en liquides d'ascites de souris.

Les tests de reconnaissance d'isolats et de souches de l'ACMV, ainsi que d'autres geminivirus, ont été réalisés à partir d'extraits bruts de plantes virosées.

3. Résultats et conclusions

Tous les isolats de l'ACMV de la collection de l'ORSTOM de Côte-d'Ivoire, ainsi que de celle de l'INRA à Colmar (isolats originaires de Côte-d'Ivoire, du Kenya, de République Centrafricaine, du Togo, du Zaïre, de Madagascar et de l'Inde), sont reconnus par les AcMc développés à l'IBMC de Strasbourg. Les réactions non spécifiques liées à l'extrait brut de plante saine (bruit de fond) sont toujours très faibles.

Nous avons testé, en parallèle, la réactivité des AcMc de l'IBMC et du SCRI, à l'égard de plusieurs geminivirus originaires de différents pays (Tableau I). Comme l'AcMc 20 du SCRI, les AcMc de la série 11 de l'IBMC reconnaissent tous les geminivirus testés, quelles que soient leurs origines géographiques ; ils sont donc dirigés contre un site antigénique commun à ces différents geminivirus. Par contre, l'AcMc 7x1 ne reconnaît que les virus africains, il se rapproche de l'AcMc 17 du SCRI.

Une première application de la reconnaissance de geminivirus hétérologues à l'aide des AcMc anti-ACMV de l'IBMC, a été réalisée en Égypte. Elle a permis de mettre en évidence le virus de l'enroulement de la tomate ("Tomato Yellow Leaf Curl Virus" ou TYLCV) sur tomate, ainsi que sur *Althaea rosea* CAV., qui présentait des symptômes rappelant ceux d'un autre geminivirus, le virus de l'enroulement du gombo ("okra leaf curl virus"). Nous avons aussi pu détecter la présence du TYLCV dans des chantillons de tomate en provenance du Burkina-Faso, du Sénégal, du

Tableau I. — Comparaison de la réactivité des anticorps monoclonaux (AcMc) dirigés contre l'ACMV à l'égard de geminivirus d'origines diverses.
Reactivity of monoclonal antibodies (AcMc) raised against ACMV towards geminiviruses from different origins.

ISOLAT VIRAL (1)	ANTICORPS MONOCLONAUX (2)									
	7x1	11x3	11x4	11x6	11x9	14	17	18	20	23
ACMV Ouest	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++
ACMV Est	+++	+++	+++	+++	+++	(+++)	+++	(+++)	+++	+++
ICMV	-	+++	+++	+++	+++	-	-	+++	+++	-
TYLCV (Sénégal)	+	++	++	++	++	-	++	+	+	+++
TYLCV (Inde)	-	+++	+++	+++	+++	-	-	+	+++	+++
OLCV	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++
EMV	-	++	++	++	++	-	-	-	++	++

(1) 1 = Mosaïque africaine du manioc, souche Afrique de l'Ouest.

2 = Mosaïque africaine du manioc, souche Afrique de l'Est

(plusieurs isolats testés).

3 = Mosaïque indienne du manioc.

(2) Anticorps monoclonaux produits à l'IBMC (7x1, 11x3, etc.), ou au SCRI (14, 17, etc.).

Dilutions des ascites : 7x1 (10^{-3}), 11x3, 11x4 et 11x9 (10^{-4}), 11x6 (10^{-5}), 11x9 (10^{-5}); dilution des surnageants de culture des

hybridomes du SCRI : 1/3.

Echelle de lecture de l'absorbance à 405 nm : - = < 0,15 ; + = 0,15 à 0,6 ; ++ = 0,6 à 1,8 ; +++ = > 1,8 ; () = variation

dans l'intensité de la réaction en fonction de l'isolat testé (ACMV Est) ; après soustraction du bruit de fond

constitué par l'extrait de plante saine.

L'ACMV est présenté sous forme d'extraits de tabacs infectés dilués de 10 à 1 000 fois.

Nigeria et de Sicile. Comme le montre la figure 1, pour la détection du TYLCV (virus hétérologue) à l'aide d'AcMc de l'ACMV, il est cependant nécessaire de remplacer le tampon conventionnel de broyage des échantillons (PBS-Tween + PVP) par un tampon Tris-HCl contenant un agent réducteur.

Enfin, nous avons mis au point pour l'ACMV et le TYLCV (Sénégal) un test DAS-ELISA utilisant deux anticorps monoclonaux, ce qui nous permet de nous libérer de la limite quantitative liée à l'utilisation d'anticorps polyclonaux de lapin qui sont différents pour chaque animal immunisé. Ce test recourt ensuite pour la révélation à l'utilisation d'un AcMc anti-souris, couplé à la biotine et qui est révélé par la streptavidine. Bien qu'il soit légèrement moins sensible que le test DAS-ELISA utilisé précédemment, ce test permet cependant des détections à des dilutions élevées, et il est tout à fait adapté au diagnostic à grande échelle, notamment dans les pays en voie de développement, objectif que nous nous étions fixé.

Remerciements

Ce travail a été financé par une convention établie entre le CNRS et l'ORSTOM. Nous remercions Mme M.M. SWANSON pour nous avoir procuré les anticorps monoclonaux du SCRI (Dundee).

Summary

Diagnosis of infection by geminiviruses by means of monoclonal antibodies raised against African Cassava Mosaic Virus

The aim of the work was to set up a detection test for Cassava mosaic virus which could be used on a large scale on the African continent. Monoclonal antibodies (AcMc) were produced against an isolate of African Cassava Mosaic Virus (ACMV), and tested for use in DAS-ELISA. Some of these AcMc allow the detection of all the different isolates of ACMV tested, and also of other geminiviruses. A DAS-ELISA test using two monoclonal antibodies has been adapted for routine use for the detection of ACMV and Tomato Yellow Leaf Curl Virus in Senegal.

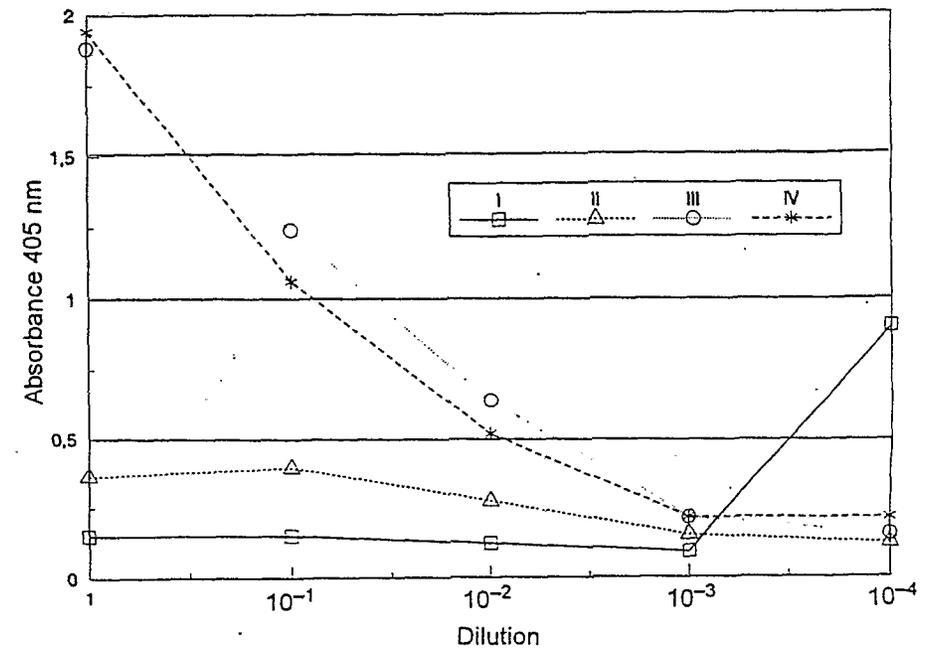


Figure 1. — Importance du tampon de broyage de l'extrait brut de plantes virosées pour la détection du virus de l'enroulement de la tomate (TYLCV) en test DAS-ELISA. Dilution en série, de 10 en 10.

Influence of the buffer used for the preparation of plant extracts for the detection of tomato yellow leaf curl virus (TYLCV) in DAS-ELISA.

Traitement I : PBS-Tween (0,5 %), 2 % PVP.

Traitement II : 0,05 M Tris-HCl (pH 8,0), 0,005 M EDTA, 2 % PVP, 0,5 % Tween.

Traitements III et IV : 0,05 M Tris-HCl (pH 8,0), 60 mM sulfite de sodium, avec ou sans mercaptoéthanol (1 %).

PBS = 0,137 M NaCl, 0,0027 M KCl, 0,0043 M Na₂ HPO₄·7H₂O, 0,0014 M KH₂PO₄ (phosphate-buffered saline).

PVP = polyvinyle pyrrolidone.

Tris = Tris(hydroxyméthyl)-aminométhane.

EDTA = Sel disodique de l'acide éthylènedinitrilotétraacétique.

Bibliographie

- BOCK K.R., GUTHRIE E.J. [1978]. Transmission of African cassava mosaic by mechanical inoculation. *Plant Dis. Rep.* 62, 580-581.
- FARGETTE D., THOUVENEL J.C., FAUQUET C. [1987]. Virus content of leaves of cassava infected by African cassava mosaic virus. *Ann. Appl. Biol.* 110, 65-73.
- HARRISON B.D., MUNIYAPPA V., SWANSON M.M., ROBERTS I.M., ROBINSON D.J. [1991]. Recognition and differentiation of seven whitefly-transmitted geminivirus from India, and their relationships to African cassava mosaic and Thailand mung bean yellow mosaic viruses. *Ann. Appl. Biol.* 118, 299-308.
- KOUNOUNGUSSA B.R., GIVORD L., WALTER B. [1989]. African cassava mosaic virus (ACMV) : stability of purified virus and improved conditions for its detection in cassava leaves by ELISA. *J. Phytopathol.* 127, 29-41.
- MUNIYAPPA V., SWANSON M.M., DUNCAN G.H., HARRISON B.D. [1991]. Particle purification, properties and epitope variability of Indian tomato leaf curl geminivirus. *Ann. Appl. Biol.* 118, 595-604.
- SEQUEIRA J.C., HARRISON B.D. [1982]. Serological studies on cassava latent virus. *Ann. Appl. Biol.* 101, 33-42.
- STOCKER J.W., FOSTER H.K., MIGGIANO V., STAHLI C., STAIGER G., TABACS B., STAEHELIN T.H. [1982]. Generation of two new myeloma cell lines "PAI" and "PAI-O" for hybridoma production. *Res. Disclosure* 217, 155-157.
- THOMAS J.E., MASSALSKI P.R., HARRISON B.D. [1986]. Production of monoclonal antibodies to African cassava mosaic virus and differences in their reactivity with other whitefly-transmitted geminiviruses. *J. Gen. Virol.* 67, 2739-2748.
- THOUVENEL J.C., FARGETTE D., FAUQUET C., MONTSARRAT A. [1984]. Serological diagnosis of African cassava mosaic by immunoenzymatic method. Proc. Sixth Int. Trop. Root Crops Symp., 21-23 Feb. 1983, Lima, Peru, 353-356.
- WARBURG O. [1894]. Die Kulturpflanzen Usambaras. *Mitt. Dtsch. Schutzgeb.* 7, 131-198.