

Identification et détection des virus

La détection et l'identification des virus font appel à différentes méthodes. Ces méthodes se caractérisent par leur spécificité et leur sensibilité.

On peut citer trois grands types de méthode de détection: la détection biologique qui se fonde sur les propriétés symptomatologiques, la détection sérologique qui cible la protéine de capsid par un anticorps et la détection moléculaire qui cible l'acide nucléique viral.

A) Détection symptomatologique

On appelle cette méthode l'**indexage biologique**. Les plantes utilisées pour ce type de tests sont : *Nicotiana tabacum*, *Nicotiana benthamiana*, *Chenopodium quinoa*, *Chenopodium amaranticolor*, Pour utiliser cette méthode, on procède à des inoculations mécaniques, c'est à dire qu'on infecte les plantes tests par simple frottement avec du jus de plante infectée. Cette méthode ne peut s'appliquer qu'aux virus transmissibles mécaniquement (virus de parenchyme).

Pour identifier les virus de la vigne, on utilise des variétés indicatrices. La variété indicatrice est utilisée comme porte-greffe et la plante à tester comme donneuse de greffon. On rabat les feuilles du greffon et on laisse se développer les feuilles du porte-greffe indicateur. La variété utilisée dépend du virus recherché. Exemples: *Vitis rupestris* St George est utilisé pour diagnostiquer le *Grapevine rupestris stem pitting associated virus* (GRSPaV) et les népovirus européens dont le *Grapevine fanleaf virus* et l'*Arabis mosaic virus*, la variété LN33 est utilisée pour diagnostiquer l'écorce liégeuse ou corky bark.

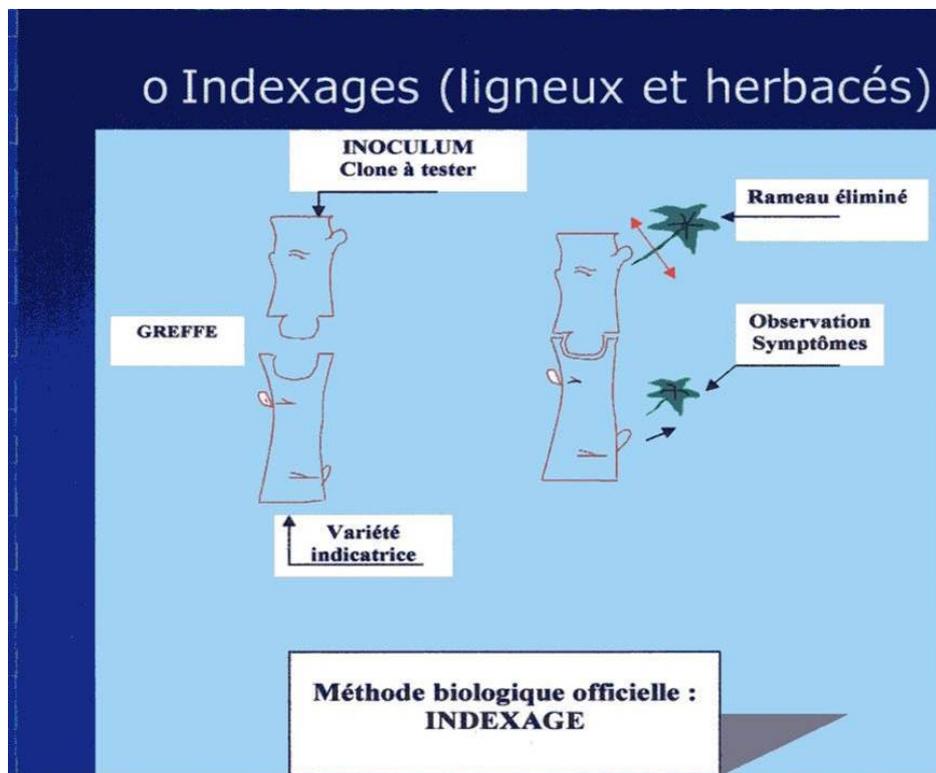
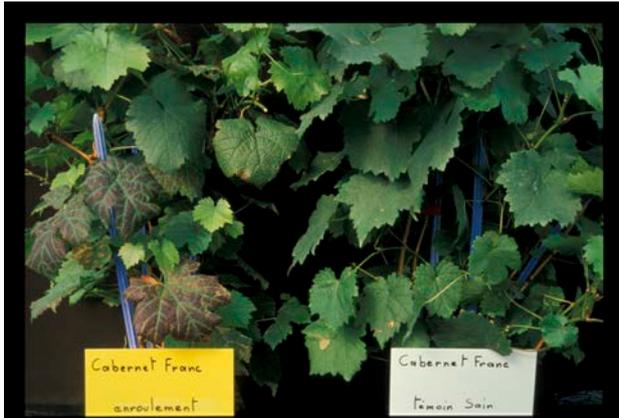


Schéma de principe de la détection par indexage. Origine : IFV

Cette technique est utilisée de façon réglementaire pour détecter les viroses principales avant de demander l'agrément d'un clone. L'IFV Pôle national matériel végétal utilise en routine cette méthode. Comme dans toute méthode de détection, il faut disposer d'un témoin positif qui extériorise des symptômes typiques auxquels on se réfère.

La technique de greffe en vert permet d'accélérer l'observation des symptômes sur la variété indicatrice.

Inconvénient de l'indexage biologique: certaines souches atténuées peuvent passer inaperçues sur l'indicateur.

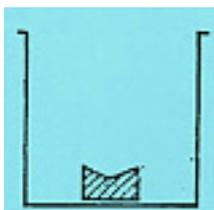


Détection du virus de l'enroulement par greffe en vert sur Cabernet. On reconnaît le rougissement des feuilles, l'enroulement des limbes vers le bas
Photo ENTAV

B) Détection sérologique

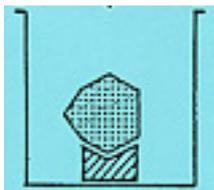
Principe: la plupart des méthodes utilisées aujourd'hui en routine sont des méthodes immuno-enzymatiques. C'est à dire qu'on utilise des anticorps provenant d'un serum pour reconnaître spécifiquement la capsid du virus et qu'ensuite la réaction antigène-anticorps est visualisée grâce à une réaction enzymatique.

Etapas du test DAS-ELISA (pour double antisandwich enzyme linked immunosorbent assay)



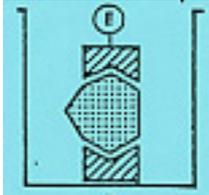
Etape 1 : Adsorption des anticorps spécifiques du virus recherché (anticorps de capture) au fond des puits de la plaque ELISA. (incubation 4 heures à 37°C ou la nuit à 4°C).

lavages



Etape 2: Jus de plante ajouté à chaque puits, si l'antigène viral est présent (c'est à dire la protéine de capsid du virus), les particules virales sont retenues par les anticorps de "capture" (incubation la nuit à 4°C ou 4 heures à 37°C).

lavages

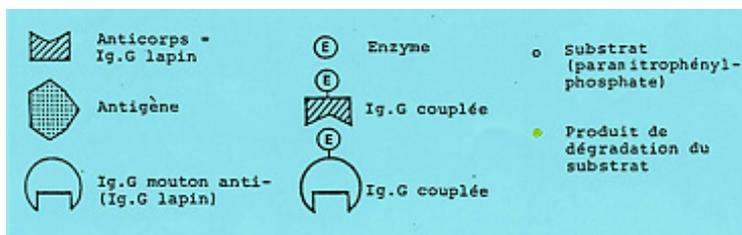


Etape 3: une deuxième couche d'anticorps couplés à une enzyme est ajoutée. Ces anticorps prennent l'antigène viral en "sandwich" (incubation 4 heures à 37°C ou la nuit à 4 °C).

lavages



Etape 4: ajout du substrat de l'enzyme. Le substrat est non coloré, en revanche le produit de la réaction est soluble et coloré (puis 1 heure après ajout du substrat, mesure des Densités Optiques (DO) de chaque puits).



légende

En général, un test Elisa se réalise sur deux jours.

On peut utiliser différentes variantes de tests immunoenzymatiques, ceci est illustré par la planche tiré du livre 'principes de virologie végétale ».

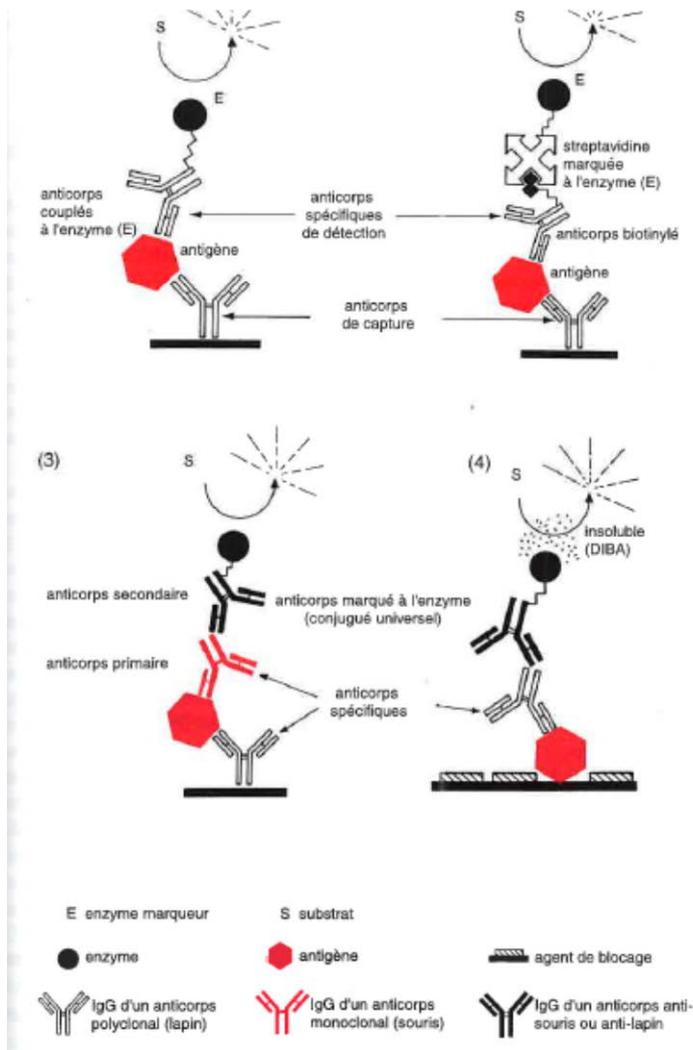


Planche extraite du livre « principes de virologie végétale » ed INRA.

Les différentes variantes du test ELISA sont présentées. En (1) le DAS-ELISA classique, en (2) utilisation d'anticorps biotinyllés et de streptavidine marquée à l'enzyme pour amplifier le signal, en (3) TAS ELISA avec utilisation d'un anticorps monoclonal en rouge et en (4) le principe d'un test DIBA : dot blot immunobinding assay sur membrane.

Bilan sur les tests immunoenzymatiques

Pour utiliser une méthode immunoenzymatique de détection, il faut disposer d'un "bon serum" à la fois sensible et spécifique. Une des premières étapes, dans la caractérisation d'un virus et la production d'un serum c'est d'établir le lien entre symptômes observés sur la plante et particules virales responsables de l'infection. Ce lien n'est pas toujours facile à mettre en évidence en particulier sur les plantes pérennes où les coinfections sont multiples et où l'inoculation à des hôtes herbacés pour concentrer le virus n'est pas toujours possible. On peut aussi se heurter à des difficultés techniques de purification du virus (particules peu concentrées, virus fragile,). Dans certains cas, il est possible d'avoir accès au génome viral sans passer par une étape de purification des particules, on peut

ainsi produire les protéines virales après clonage dans un vecteur d' expression bactérien. On utilise ensuite ces protéines comme antigène. En dépit de ces difficultés, il existe de nombreux sérums commerciaux contre des virus de plantes et les tests immunoenzymatiques sont couramment utilisés en routine du fait de la facilité de leur mise en œuvre.

C) Détection moléculaire

Les méthodes moléculaires ont pour cible l'acide nucléique viral.

Il existe deux grands types de méthodes moléculaires: **l'hybridation** et **l'amplification**.

L'hybridation consiste à hybrider (apparié) l'acide nucléique viral dénaturé avec une sonde **marquée** également dénaturée. On repère l'hybridation grâce au marquage de la sonde. Ce marquage peut être radioactif et on repère l'hybridation par autoradiographie d'une membrane, on peut aussi réaliser des marquages froids c'est à dire avec un composé non radioactif.

Cette méthode de détection est encore utilisée mais elle a été supplantée en test de routine par le test PCR (polymerase chain reaction).

L'amplification : cette méthode repose sur l'amplification d'un fragment du génome viral par la technique de PCR (Polymerase Chain Reaction). Le principe de la méthode est illustré sur le schéma ci-dessous. Deux amorces d'une vingtaine de nucléotides sont utilisées. Elles sont spécifiques de l'ADN cible et on remarque qu'au final c'est la région d'ADN comprise entre ces deux amorces qui se retrouve amplifiée (séquences des amorces comprises).

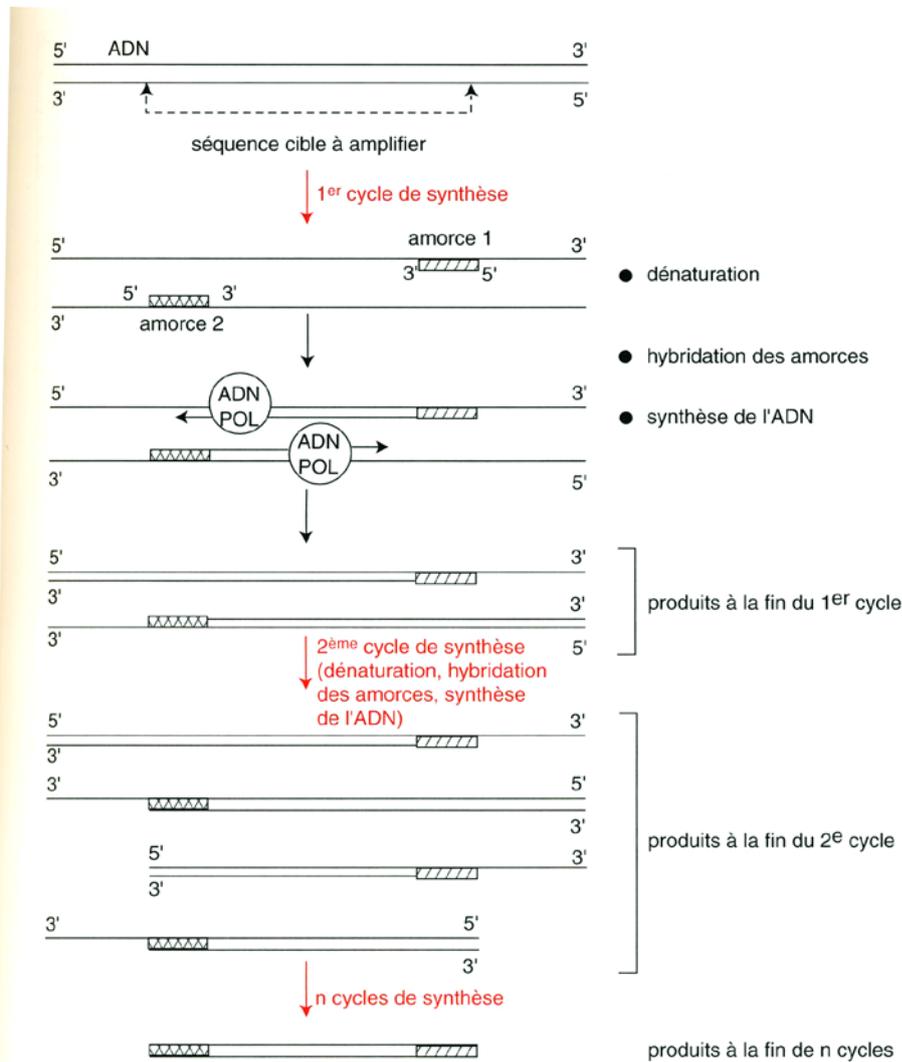


Schéma montrant le principe d'une amplification PCR. L'amplification est permise grâce à la succession de cycles: dénaturation, hybridation, polymérisation.

Schéma extrait de principes de virologie végétale, INRA éditions, 2001.

Figure 9.22 – Schéma d'un test d'amplification enzymatique.

Remarque: beaucoup de virus de plantes ont pour génome de l'ARN. Il est alors nécessaire de rajouter une étape préliminaire de reverse transcription (synthèse d'ADNc) d'un fragment du génome viral avant de procéder à la réaction PCR. Cette reverse transcription peut se réaliser avec de courts oligomères de séquences aléatoires (hexamères aléatoires en général) ou bien une amorce spécifique comme l'amorce 1 du schéma précédent, par exemple.

Mise en œuvre d'un test PCR

Un milieu réactionnel pour PCR contient

L'ADN cible initial qui suivant le cas est l'ADN viral ou de l'ADN complémentaire synthétisé dans une étape préliminaire.

Deux amorces qui s'hybrident l'une sur le fragment sens l'autre sur le fragment antisens et qui délimite la zone amplifiée.

Des déoxynucléotides (les dNTPs)

Du magnésium (Mg^{2+}) (cofacteur de l'enzyme)

De la Taq polymérase: une ADN polymérase qui peut fonctionner à 72 °C et supporter une température de 94°C sans se dénaturer.

Après amplification, on réalise une séparation électrophorétique sur gel d'agarose. La présence d'ADN est visualisée grâce à un agent intercalant de l'ADN, par exemple : le bromure d'éthidium, fluorescent aux UV.

La PCR quantitative ou PCR en temps réel : dans cette technique, on suit l'accumulation de l'ADN amplifié au cours des cycles. Grâce à ce suivi une quantification de l'ADN cible de départ est possible. La PCR quantitative peut être utilisée dans un but de détection, par exemple pour des virus très peu concentrés ou pour faire des suivis d'accumulation de particules virales dans un insecte vecteur.

Pour plus de précisions sur le PCR et la PCR quantitative on pourra consulter les deux TD consacrés à ce sujet dans l'UE3-1 (Tronc commun ingénieur agronome / Montpellier SupAgro).