



HAL
open science

Purification de particules virales associées à l'enroulement de la vigne et mise au point d'un protocole ELISA permettant leur détection

D. Zimmermann, Bernard Walter, Olivier O. Le Gall

► To cite this version:

D. Zimmermann, Bernard Walter, Olivier O. Le Gall. Purification de particules virales associées à l'enroulement de la vigne et mise au point d'un protocole ELISA permettant leur détection. *Agronomie*, 1988, 8 (8), pp.731-741. hal-02720040

HAL Id: hal-02720040

<https://hal.inrae.fr/hal-02720040>

Submitted on 1 Jun 2020

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

PATHOLOGIE VÉGÉTALE

Purification de particules virales associées à l'enroulement de la vigne et mise au point d'un protocole ELISA permettant leur détection

Didier ZIMMERMANN, Bernard WALTER, Olivier LE GALL (*)

avec la collaboration technique de Laurent ÉTIENNE

I.N.R.A., Station de recherche « Vigne et Vin », Laboratoire de Pathologie, B.P. 507, F 68021 Colmar

(*) Adresse actuelle : I.N.R.A., Station de Pathologie végétale, Centre de Recherches de Bordeaux, B.P. 131, F 33140 Villenave-d'Ornon

RÉSUMÉ

Des particules virales de type clostérovirus ont été purifiées de vignes atteintes d'enroulement. Ces particules sont extraites par une précipitation fractionnée au polyéthylène glycol (PEG 6000) permettant de réduire la proportion de contaminants végétaux. Elles sont finalement purifiées par centrifugation dans un gradient de saccharose.

Les nucléoprotéines virales sont injectées à un lapin afin de produire les immunoglobulines nécessaires à leur détection en ELISA (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay). Parallèlement, les mêmes particules virales ont servi à l'immunisation d'une poule et à l'extraction d'immunoglobulines à partir des œufs recueillis. L'utilisation simultanée d'immunoglobulines de poule (IgG^C), et de gammaglobulines de lapin (IgG^R) préalablement absorbées par des extraits foliaires de vigne saine, permet la détection de vignes atteintes d'enroulement au moyen d'un protocole ELISA indirect. La comparaison d'extraits végétaux provenant de différents organes de vigne malade montre que les feuilles constituent l'organe de choix pour la détection sérologique des particules de type clostérovirus.

Afin de vérifier la corrélation entre la présence de particules virales filamenteuses et l'observation des symptômes d'enroulement, nous avons éprouvé 61 vignes de différents cultivars par le procédé ELISA indirect. Des réactifs immunochimiques spécifiques de particules de type clostérovirus isolées de vignes atteintes d'enroulement nous ont été fournies par le Dr GUGERLI (*GLRVI*) et le Dr GONSALVES (*NY-1*). Leur utilisation en ELISA a permis une analyse complémentaire des 61 vignes mentionnées ci-dessus.

Parmi les 50 vignes montrant des symptômes d'enroulement, 44 réagissent dans au moins un des 3 systèmes ELISA employés. Aucune vigne saine ne réagit en ELISA. Deux virus différents liés à l'enroulement ont été distingués sur la base des réactions sérologiques obtenues.

Des travaux d'immunomicroscopie (ISEM) complètent les études sérologiques en ELISA.

Mots clés additionnels : *Particules virales de type clostérovirus, purification, sérologie.*

SUMMARY

Purification of virus particles associated with grapevine leafroll disease and development of an ELISA procedure to allow their detection.

Closterovirus-like particles were purified from leafroll-diseased grapevines. These particles were extracted from leaves by a fractionated PEG precipitation and purified by centrifugation through a sucrose gradient. The purified nucleoproteins were injected into a rabbit to produce immunoglobulins (IgG^R) useful for the development of an enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). The same closterovirus particles were used to immunize a hen in order to extract immunoglobulins from egg yolk IgG^C. The simultaneous use of yolk IgG^C and IgG^R absorbed with healthy leaf extracts allowed the detection of leafroll-diseased grapevines by ELISA. Comparison of extracts from different grapevine organs showed that leaves were the best source of material for routine diagnosis. In order to check the correlation between leafroll symptoms and the presence of closterovirus-like particles, we analysed 61 grapevines from different sources. Immunochemical reagents specific to closterovirus particles isolated from leafroll-affected grapevines obtained by Dr GONSALVES (*NY-1*) and Dr GUGERLI (*GLRVI*) were also used in these serological analyses. Among the 50 diseased grapevines, 44 showed reactions in at least one of the ELISA procedures. None of the healthy grapevines reacted in the ELISA mentioned previously. Two different viruses could be distinguished on the basis of these serological reactions. Using immunosorbent electron microscopy (ISEM), we checked the reactions observed in ELISA.

Additional key words : *Closterovirus-like particles, purification, serology.*

I. INTRODUCTION

L'enroulement de la vigne est une maladie de type viral mondialement répandue. Elle a été décrite dans de nombreux vignobles européens et d'Amérique du Sud, en Israël, en Afrique du Sud, en Australie et en Nouvelle-Zélande. Par contre certains vignobles asiatiques isolés semblent indemnes.

Sa présence diminue, parfois de manière considérable, la qualité et la quantité des récoltes (LEGIN, 1972; GALET, 1977; WALTER & LEGIN, 1986).

L'enroulement est actuellement détecté par greffage sur des variétés indicatrices qui extériorisent des symptômes caractéristiques. Les variétés *Vitis vinifera* « Pinot Noir » et *Vitis riparia* « Gloire » — utilisées à Colmar — permettent de distinguer 2 formes d'enroulement (WALTER & LEGIN, 1986).

Un syndrome particulier — « l'enroulement à nervures jaunes du Chardonnay » — se propage depuis quelques années dans les vignobles champenois (CAUDWELL *et al.*, 1983). Il se distingue des autres formes d'enroulement par la rapidité de la contamination dans les parcelles atteintes (WALTER & LEGIN, 1986).

Le (ou les) virus responsables des enroulements ne sont pas clairement identifiés. Différents types de particules ont été décrits, en relation avec l'enroulement : un potyvirus (TANNE *et al.*, 1977) et des clostérovirus de diverses longueurs [1 100 nm — NAMBA *et al.*, 1979; 800 nm — CONTI *et al.*, 1980; CORBETT *et al.*, 1984; CONTI & MILNE, 1985; 2 000 nm — VON DER BRELIE & NIENHAUS, 1982; GUGERLI *et al.*, 1984; 300 nm (probablement des fragments de GVB) — MILNE *et al.*, 1984; 2 200 nm (type I) et 1 800 nm (type II), ROSCIGLIONE & GUGERLI, 1986 : non précisée — FAORO *et al.*, 1981]. Des particules virales sphériques ont également été observées (GUGERLI *et al.*, 1984).

La purification de particules de type clostérovirus associées à l'enroulement de la vigne et la préparation de réactifs spécifiques sont décrits ci-dessous. La mise au point d'un protocole ELISA a rendu possible l'analyse sérologique des vignes atteintes des 3 formes d'enroulements reconnues dans les vignobles français (E/PN, sur Pinot Noir; E/R, sur Riparia; ENJ à Nervures Jaunes). Une étude sérologique complémentaire conclut cette étude. Elle a été réalisée au moyen de réactifs *GLRV1* (GUGERLI *et al.*, 1984), *GLRV-1 Colmar*, *NY-1* (ZEE *et al.*, 1987), et *GVA* (CONTI *et al.*, 1980), tous spécifiques de clostérovirus isolés de vignes malades.

II. MATÉRIEL ET MÉTHODES

A. Matériel végétal

Les plants de vignes atteints d'E/PN ou d'E/R, ainsi que les plants sains (exempts d'enroulement) proviennent pour la plupart de nos collections.

Des échantillons recueillis dans le vignoble champenois, présentant ou non le syndrome de l'enroulement à Nervures Jaunes (ENJ) ont été analysés avec la collaboration du Comité Interprofessionnel des Vins de Champagne (CIVC).

Les expérimentations ont porté sur des plants cultivés à l'extérieur ou en serre.

B. Purification des particules virales

La purification des particules de type clostérovirus est proche de la méthode bentonite/polyéthylèneglycol décrite pour la purification du Chlorotic Leaf Spot Virus (CLSV) (LISTER & HADIDI, 1971).

Cinquante grammes de feuilles de vigne sont pulvérisés dans un mortier en présence d'azote liquide et la poudre obtenue est mise en suspension dans 200 ml de tampon d'extraction dont la composition est voisine de celui décrit par GUGERLI *et al.* (1984) Tris-HCl 0,2 M, pH 8,2, Polyclar AT 4 p. 100, Triton × 100 1 p. 100, EDTA 10 mM, 2-mercaptoéthanol 0,2 p. 100.

Une suspension de bentonite à 100 mg/ml est ajoutée goutte à goutte jusqu'à une concentration finale de 0,1 p. 100 (poids/volume). Après homogénéisation à 4 °C pendant 20 min et filtration sur toile de coton, l'extrait est centrifugé à 7 500 g pendant 15 min.

Des tentatives de clarification par des solvants organiques ont été effectuées à ce stade. Dans un cas, 8 p. 100 (vol/vol) de n-butanol sont ajoutés au surnageant et mis sous agitation 1 h à 4 °C. Une autre tentative a été effectuée par l'emploi de tétrachlorure de carbone à 25 p. 100 (vol/vol) sous agitation pendant 10 min à 4 °C.

Une première précipitation au polyéthylèneglycol (PEG 6000) à 4 p. 100 est effectuée sur le surnageant pendant 1 h à 4 °C. Après centrifugation à 7 500 g pendant 30 min, une seconde précipitation à 8 p. 100 (4 + 4 p. 100) sur le surnageant est réalisée aux mêmes conditions que précédemment pour précipiter les virus. Le culot est remis en suspension dans 30 ml de tampon Tris-HCl 0,01 M, pH 8,2 et clarifié par une centrifugation à 10 000 g pendant 30 min. Le surnageant est ensuite déposé sur un coussin de 3 ml de saccharose à 20 p. 100 (p/vol) dans le tampon Tris-HCl 0,01 M, pH 8,2 et centrifugé à 85 000 g (Rotor Beckman R30) pendant 2 h à 5 °C (GUGERLI *et al.*, 1984). Les culots sont repris dans 2 ml de tampon Tris HCl 0,01 M, MgCl₂ 10 mM.

Les particules virales sont purifiées par centrifugation sur gradients de densité de saccharose. Ceux-ci sont constitués de couches successives de 6 ml chacune de solutions à 50, 40, 30, 20 et 10 p. 100 de saccharose dans le tampon Tris HCl 0,01 M pH 8,2 laissées à diffuser pendant une nuit à 4 °C. Un à 2 ml de l'extrait semi-purifié sont déposés au sommet du tube et centrifugés à 105 000 g pendant 5 h à 5 °C (Rotor MSE SW 25).

Les gradients sont récoltés par fractions de 1,2 ml au moyen d'un collecteur de gradient ISCO 640 et analysés par spectrophotométrie à 254 nm (ISCO UA-5 ultraviolet analysé).

C. Sérologie

1. Production de réactifs

a) Réactifs

Les fractions de gradient de saccharose contenant des particules de type clostérovirus extraites d'une vigne

malade (Klevener) sont réunies en un seul lot. L'immunisation d'animaux par cette préparation virale conduit à l'obtention des réactifs *GLRV1 Colmar*.

Nous disposons également de réactifs *GLRV1* et *NY-1*, spécifiques de particules filamenteuses extraites de vignes malades d'enroulement fournis respectivement par le Dr GUGERLI (GUGERLI *et al.*, 1984) et par le Dr GONSALVES (ZEE *et al.*, 1987).

Un sérum de lapin spécifique de clostérovirus (*GVA*) extraits de vignes atteintes de la maladie des cannelures nous a été fourni par le Dr LUISONI (CONTI *et al.*, 1980).

b) Immunisation d'animaux

La première injection d'extrait viral additionné d'un volume d'adjuvant complet de Freund est effectuée sous la peau, au niveau de la patte arrière chez le lapin, dans la cuisse chez la poule.

Les injections suivantes sont effectuées de la même manière avec l'extrait viral additionné d'un même volume d'adjuvant incomplet. Elles ont lieu tous les 8 jours chez le lapin, tous les 15 jours chez la poule. Les prises de sang du lapin débutent à partir de la quatrième injection et sont espacées de 15 jours. Chez la poule les œufs sont récoltés quotidiennement et stockés à 4 °C.

c) Préparation des réactifs

Les gamma globulines de lapin (IgG^R) sont extraites par la méthode au rivanol (HARDIE & VAN REGENMORTEL, 1977) et conservées à - 20 °C à une concentration de 1 mg/ml estimée par mesure de l'absorption à 280 nm d'après la relation $E^{0,1 \text{ p. } 100} = 1,4$ (GERRIE & CLEM, 1969).

La purification des immunoglobulines de poules IgG^C est réalisée d'après une méthode proche de celle décrite par POLSON *et al.*, (1980). Les jaunes d'œufs sont séparés des blancs et homogénéisés dans 2 volumes de tampon phosphate salin pH 7,4 (PBS). Après élimination des lipoprotéines et de l'albumine résiduelle par précipitation au PEG 6000 (3,5 p. 100), les IgG^C sont extraites par 2 cycles de précipitation à 12 p. 100 de PEG 6000. Une ultime clarification au chloroforme (1/2 volume sous agitation pendant 5 min) est suivie d'une centrifugation pendant 10 min à 14 000 g.

d) Marquage à la phosphatase alcaline (PAL)

La méthode de couplage des anticorps à la phosphatase alcaline est celle décrite par AVRAMEAS en 1969. Les anticorps conjugués à l'enzyme sont stockés à 4 °C.

2. Test immunoenzymatique ELISA

a) Préparation des échantillons de vigne

Plusieurs organes de vigne ont été analysés en ELISA. Ces organes sont broyés dans un mortier en présence de 5 volumes de tampon d'extraction. Une centrifugation à 2 000 g pendant 15 min permet de séparer les débris végétaux du jus brut.

b) Protocoles ELISA

• DAS-ELISA

Le déroulement du test est identique à celui décrit par CLARK en 1981. Les cupules des plaques de polystyrène (Nunc 96F) sont tapissées d'une solution d'IgG^R à 1 µg/ml dans un tampon carbonate de sodium 0,05 M pH 9,6 et incubées 3 h à 37 °C. L'incubation de 200 µl de solution d'albumine de sérum de bœuf (BSA) à 1 p. 100 dans le PBS-T pendant 1 h à 37 °C permet une saturation des plaques.

Les extraits végétaux mis sur la plaque (200 µl) sont incubés à 4 °C pendant une nuit. Les IgG^R (200 µl) couplées à la PAL utilisées au 1/1000 dans un tampon PBS-T 0,1 p. 100 de BSA, sont incubées pendant 2 h à 37 °C. Après rinçage, 200 µl d'une solution de p-nitrophényl phosphate à 1 mg/ml dans un tampon diéthanolamine 0,1 p. 100, pH 9,8 sont incubés à 37 °C.

La réaction immunoenzymatique est mesurée à 405 nm au moyen d'un lecteur de type Titertek Multiskan.

• ELISA indirect

Les IgG^C de poule sont purifiées à partir de lots de 4 œufs. Leur efficacité, selon la chronologie de la ponte, est éprouvée dans un procédé ELISA indirect. L'emploi des IgG^R permet de détecter les particules virales retenues sur la plaque par les IgG^C, les jus bruts de feuilles de vignes constituant la source d'antigènes.

Pour la réalisation du test ELISA indirect, 200 µl d'IgG^C utilisées à 5 µg/ml dans le tampon carbonate sont déposés dans chaque puits et incubés pendant 3 h à 37 °C. Après saturation des plaques par la BSA, les extraits foliaires sont incubés pendant une nuit à 4 °C. Les cupules sont rincées et on ajoute 200 µl d'une solution d'IgG^R à 1 µg/ml dans un tampon PBS-T, 0,1 p. 100 BSA que l'on met à incuber 2 h à 37 °C. Après un nouveau cycle de lavage, on dispose 200 µl d'IgG de chèvre anti-lapin marqué à la phosphatase alcaline (GAR-PAL) (SIGMA A8025) pendant 2 h à 37 °C. Les conditions d'utilisation du substrat et la lecture de la densité optique sont identiques à celles du procédé DAS-ELISA.

• Amélioration du protocole ELISA

Afin de diminuer les bruits de fond occasionnés par la formation de complexes [Ig-déterminants de plante], les anticorps utilisés pour la seconde étape du test peuvent être préalablement épuisés par incubation en présence de jus brut de vigne saine (procédé 1). Les immunoglobulines de lapin sous forme libre (ELISA indirect) ou conjugués (DAS-ELISA) sont préparées dans une solution PBS-T, 0,1 p. 100 de BSA. Immédiatement avant leur distribution dans les cupules, les immunoglobulines en solution sont additionnées de 10 p. 100 (v/v) de jus brut de plante saine. Ce mélange est ajouté à raison de 200 µl par puits et laissé à incuber pendant 2 h à 37 °C.

Une autre méthode, consiste à épuiser les IgG^R par le procédé décrit ci-dessous (procédé 2). 500 µl d'une solution d'IgG à 1 mg/ml sont mis en présence d'un même volume d'un extrait semi-purifié de feuilles de vigne

saine. Pour la préparation de cet extrait le protocole est celui employé pour la purification du virus ; seul le fractionnement en gradient de densité n'est pas effectué. Après incubation pendant une nuit à 4 °C, le mélange est centrifugé pendant 5 min à 10 000 g afin de sédimenter les anticorps liés aux protéines de plante. Les IgG du surnageant sont purifiées par la méthode au rivanol.

3. Immunomicroscopie

Les préparations de particules virales purifiées sont observées selon 2 techniques d'immunomicroscopie.

a) ISEM (Immunosorbent electron microscopy)

Des grilles carbonées recouvertes d'un film de parlodion sont déposées sur 40 µl d'une solution d'IgG^C diluées au 1/100. Après adsorption des anticorps sur le film, l'excès d'immunoglobulines est éliminé par 3 lavages successifs sur une goutte de tampon TAM (Tris 0,04 M, MgCl₂ 0,01 M, NaN₃ 0,01 M), (WURTZ, 1983). Les grilles sont séchées à l'aide d'un papier buvard et déposées sur une goutte de préparation de virus purifiés pendant 1 h à 20 °C. Après un cycle de lavage, les grilles sont colorées par l'emploi d'une solution d'acétate d'uranyle à 2 p. 100 dans de l'eau.

b) Décoration

Les grilles sont déposées sur une goutte de virus purifié pendant 15 min à 20 °C. Après un cycle de lavage, elles sont déposées sur une goutte d'IgG^R ou d'IgG^C pendant 30 min à 20 °C. Ces anticorps sont à une concentration de 40 µg/ml dans une solution phosphate salin 0,015 M pH 7,4. La méthode de coloration des grilles est identique à celle du procédé ISEM.

La combinaison de ces 2 techniques est également employée pour la décoration de virus fixés sur la grille préalablement sensibilisée par des immunoglobulines.

III. RÉSULTATS

A. Purification des particules virales

1. Conservation du matériel végétal

Des essais de purification ont été réalisés sur des feuilles fraîchement récoltées et sur des feuilles conservées à -20 °C. Dans l'ensemble, les observations en microscopie électronique montrent une concentration plus importante des particules de type clostérovirus dans les extraits obtenus à partir de matériel frais.

2. Méthode de broyage

Un lot de feuilles récoltées sur une vigne atteinte de l'enroulement est divisé en 2 lots de même poids. Un des lots est pulvérisé dans un mortier en présence d'azote

liquide. Le second est broyé à l'aide d'une presse à rouleaux (presse Pollähne). Les extraits recueillis sont clarifiés par centrifugation. Le contenu de ces 2 préparations est éprouvé dans un procédé ELISA indirect. On note une intensité de réaction 2 fois plus grande avec l'extrait obtenu en présence d'azote liquide par rapport au broyage à la presse Pollähne (fig. 1). Des observations en microscopie électronique confirment cette différence : les particules de type clostérovirus sont plus nombreuses après congélation et broyage des feuilles à l'azote liquide.

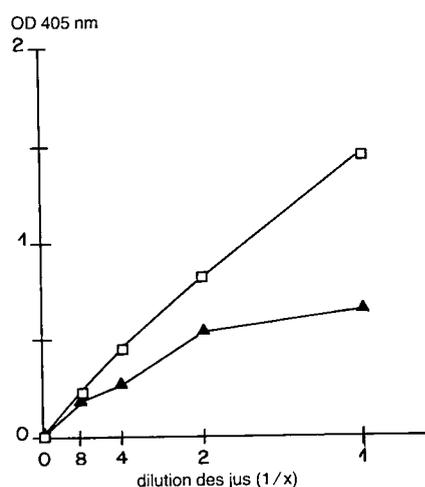


Figure 1

Influence de la méthode de broyage sur le rendement de la purification. Des feuilles de vigne malade sont broyées selon deux méthodes : Presse Pollähne (P.P. ▲) ou broyage dans un mortier en présence d'azote liquide (N.liq. □). Après clarification du jus par une centrifugation à basse vitesse, des aliquots des 2 préparations (P.P. et N.liq.) sont analysés à différentes dilutions dans un procédé ELISA indirect : 200 µl d'IgG^C à 5 µg/ml sont déposés dans les cupules de la plaque et incubés 3 h à 37 °C.

Après saturation de la plaque à la BSA, les jus de plante (200 µl) sont incubés une nuit à 4 °C. Les cupules sont rincées, et 200 µl d'IgG^R épuisés par 10 p. 100 de jus brut de vigne saine sont incubés à 1 µg/ml pendant 2 h à 37 °C. Le conjugué GAR-PAL utilisé au 1/2 000 est incubé 2 h à 37 °C. La réaction (DO 405 nm) est mesurée après 1 h d'hydrolyse du substrat.

Influence of grinding method on the purification yield.

Fresh diseased leaves were ground in two different conditions : roller press (P.P. ▲) or powdered in liquid nitrogen in a mortar (N.liq. □). After clarification, different dilutions of the preparations (P.P. and N.liq.) were analysed in different sap dilutions in an indirect ELISA procedure. Coating 200 µl IgG^C (5 µg/ml). Saturation PBS-T, 1 % BSA. Leaf extracts (200 µl) were incubated overnight at 4 °C. IgG^R (200 µl) absorbed with healthy leaf extracts used at a 1 µg/ml concentration and incubated 2 h at 37 °C. A goat anti-rabbit conjugate (GAR-PAL) was used at a 1/2 000 concentration and the optical densities were measured after 1 h of substrate hydrolysis.

3. Clarification par des solvants organiques

Dans la perspective d'éliminer les contaminants cellulaires, plusieurs méthodes de clarification par des solvants organiques ont été essayées. L'utilisation de n-butanol à 8 p. 100 ou de chloroforme à 25 p. 100 entraîne une perte importante de matériel viral. Aucune réaction dans un protocole DAS-ELISA n'est observée à l'analyse des fractions de gradient. Les observations en microscopie électronique confirment l'absence de particules virales.

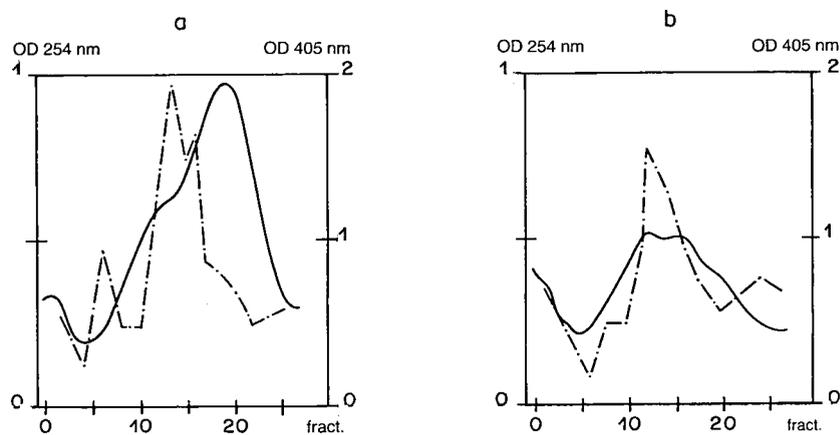


Figure 2

Amélioration de la purification par précipitation fractionnée au PEG.

Gradient de saccharose 10-50 p. 100 dans un tampon 0,01 M Tris-HCl pH 8,2. Centrifugation à 105 000 g pendant 5 h 5 °C. Analyse du gradient à 254 nm (—). Les fractions du gradient sont éprouvées en ELISA (·-·).

a : Précipitation par 8 p. 100 de PEG 6000.

b : Précipitation fractionnée 4 p. 100 + 4 p. 100 de PEG 6000.

Progress in virus purification by a fractionated PEG precipitation.

Sucrose gradient 10-50 % in 0,01 M pH 8,2 buffer. Centrifugation 5 h, 105 000 g at 4 °C. Gradients analysed by spectrophotometry at 254 nm wavelength (—), and for serological reaction in ELISA (·-·).

a : PEG 6000 precipitation 8 %.

b : Fractionated precipitation 4 % + 4 % PEG 6000.

4. Précipitation fractionnée

Une variante de la méthode de LISTER & HADIDI (1971) a été introduite par l'utilisation d'une précipitation fractionnée au PEG.

La figure 2a illustre le profil d'un gradient de densité après une précipitation au PEG 8 p. 100. Parallèlement la figure 2b montre un profil de gradient de densité après une précipitation fractionnée utilisant une première concentration de PEG à 4 p. 100, puis une seconde à 4 p. 100.

Dans les 2 cas, la localisation du matériel viral est réalisée par un test ELISA. La comparaison des 2 figures (a et b) montre qu'il est possible d'éliminer une quantité appréciable de matériel végétal lors de la précipitation fractionnée au PEG. Cette élimination ne modifie pas la concentration des particules virales comme l'indiquent les réactions ELISA.

B. Détection par ELISA

1. Mise au point des protocoles ELISA

Les méthodes d'épuisement décrites dans « Matériel et Méthodes » ont été éprouvées dans les deux protocoles ELISA.

La figure 3 montre l'efficacité de ces deux méthodes dans le protocole ELISA indirect. Les deux procédés d'épuisement permettent une forte diminution de la réaction du témoin sain. Parallèlement on note une diminution de valeur des densités optiques lues pour les extraits foliaires malades. Ainsi, en optant pour la méthode qui permet la plus grande différence de densité optique entre les extraits sains et malades, nous avons retenu la méthode d'épuisement n° 1.

Afin d'optimiser les conditions d'épuisement des IgG^R, nous avons employé différentes proportions de

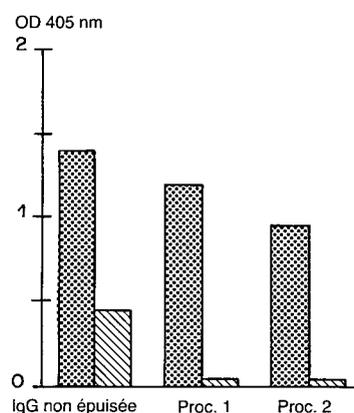


Figure 3

Trois variantes d'utilisation des IgG^R de lapin pour la détection de vignes malades dans un protocole ELISA indirect : 200 µl d'IgG^R à 5 µg/ml sont incubées pendant 3 h à 37 °C. Après saturation des plaques à la BSA, les jus bruts de vignes saines (Ts) et malades (Tm) sont disposés dans les cupules et incubés une nuit à 4 °C. Les IgG^R (1 µg/ml) sont utilisées sous forme épuisées (procédé 1 et 2) ou non. Un conjugué (GAR-PAL) permet de révéler les IgG^R. La lecture est effectuée après 45 min d'incubation du substrat.

Utilisation of IgG^R under three different conditions for the detection of diseased grapevines by ELISA : coating 200 µl of IgG^R (5 µg/ml) for 3 h at 37 °C. After saturation with BSA, leaf extracts were incubated overnight at 4 °C (Tm : diseased grapevine, Ts : healthy grapevine). IgG^R were used directly or after absorption (procedures 1 and 2). A goat anti-rabbit conjugate (GAR-PAL) allowed the detection of the IgG^R used previously. Optical densities were measured after 45 min of substrate hydrolysis.

jus brut de vigne saine. L'utilisation d'une proportion de 5 à 15 p. 100 permet une réduction des bruits de fond d'environ 0,4 unité de densité optique. Dans ces conditions les valeurs de D.O. des témoins malades restent inchangées.

Le procédé d'épuisement 1 a été analysé dans le protocole DAS-ELISA. La réaction des extraits foliaires de vignes atteintes d'enroulement est au moins deux

fois supérieure à celle du témoin sain. Néanmoins, malgré l'épuisement des IgG^R par du jus brut de feuilles saines, on note un bruit de fond trop élevé avec le témoin sain. Dans l'ensemble les valeurs moyennes des densités optiques sont respectivement égales à 0,5 et 1,2 pour les témoins sains et malades (fig. 4). Contrairement au DAS-ELISA, le protocole indirect, rendu possible par l'emploi d'IgG^C se traduit par une réaction beaucoup plus faible vis-à-vis des échantillons de vignes saines. La figure 4 illustre cette différence. Dans les deux cas, les IgG^R de lapin sont incubés en présence de 10 p. 100 de jus brut de vigne saine.

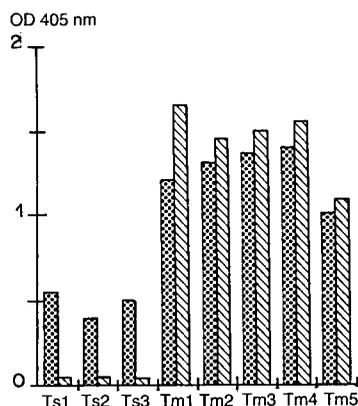


Figure 4

Efficacité de détection de vignes malades dans un procédé DAS-ELISA, et dans un procédé ELISA indirect.

Cinq échantillons de vignes malades et 3 échantillons de vignes saines sont éprouvés par les 2 protocoles.

DAS-ELISA (▨) : les IgG^R (1 µg/ml) sont incubées 3 h à 37 °C. Après saturation de la plaque à la BSA, les jus bruts sont déposés dans les cupules pendant une nuit à 4 °C. Les IgG^R couplées à la phosphatase alcaline sont épuisées par 10 p. 100 de jus brut de vigne saine et utilisées au 1/1 000. Les conditions d'utilisation des réactifs dans le procédé ELISA indirect (•) sont précisées fig. 1.

Detection of diseased grapevines by DAS-ELISA and indirect ELISA. Five diseased and three healthy grapevines were analysed by two ELISA procedures.

DAS-ELISA (▨) : coating IgG^R (1 µg/ml), 3 h at 37 °C. After the saturation step, the leaf extracts (Tm diseased grapevine, Ts : healthy grapevine) were incubated overnight at 4 °C. IgG^R coupled with alkaline phosphatase were absorbed with healthy leaf extracts and used at 1/1 000 concentration.

Indirect procedure (•) conditions were mentioned fig. 1.

Cette différence de réaction vis-à-vis du témoin sain peut s'expliquer de deux manières. D'une part, le marquage des immunoglobulines à l'enzyme peut entraîner une perte d'affinité des anticorps dans le protocole DAS-ELISA ; d'autre part, il est possible que les immunoglobulines de poule soient plus spécifiques que celles extraites du sérum de lapin.

Afin de vérifier ces deux hypothèses, nous avons comparé la spécificité respective des deux protocoles, en utilisant dans les deux cas les immunoglobulines de poule en première couche (fig. 5). Les IgG^R sont utilisées sous forme libre (INDIRECT) ou conjuguées à la phosphatase alcaline (DIRECT). Un test classique (DAS-ELISA) employant des IgG^R en première couche est également représenté figure 5. On note une grande spécificité des immunoglobulines de poule pour la sélection des particules virales sur la plaque de microtitration. La réaction est plus élevée avec le témoin malade dans la méthode indirecte que dans la méthode directe.

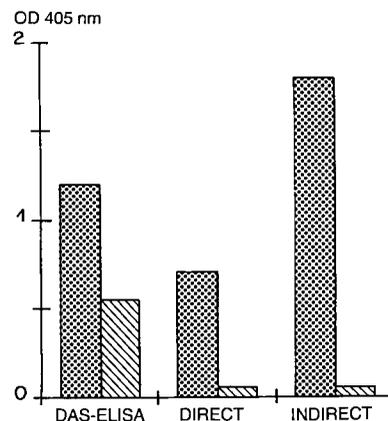


Figure 5

Efficacité des IgG^R sous forme libres (ELISA indirect), ou conjuguées à l'enzyme (ELISA direct), pour la détection de vignes malades.

Après incubation des IgG^C (5 µg/ml) et saturation des puits à la BSA, les jus bruts du témoin sain (Ts) et du témoin malade (Tm) sont incubés une nuit à 4 °C.

ELISA direct : IgG^R-PAL (1/1 000).

ELISA indirect : IgG^R (1 µg/ml), GAR-PAL (1/2 000).

Les IgG^R et le conjugué sont épuisés par du jus brut de vigne saine et incubés pendant 2 h à 37 °C. Substrat 1 h à 37 °C.

Les conditions du procédé DAS-ELISA sont identiques à celles décrites fig. 4.

Reactivity of rabbit IgG, in a direct ELISA procedure, or in an indirect ELISA procedure when coupled with the enzyme (PAL).

Coating IgG^C (5 µg/ml) 3 h at 37 °C, saturation. Leaf extracts were incubated overnight at 4 °C (Tm = diseased grapevine, Ts = healthy grapevine).

Direct procedure : IgG^R-PAL (1/1 000) were incubated 2 h at 37 °C.

Indirect procedure : IgG^R (1 µg/ml) were incubated 2 h at 37 °C and revealed with GAR-PAL (1/2 000).

In each procedure, IgG^R were previously absorbed with healthy leaf extracts.

Conditions of the DAS-ELISA procedure are described fig. 4.

Cet avantage s'explique, d'une part, par l'utilisation d'une étape supplémentaire permettant une amplification de la réaction, d'autre part par l'emploi d'IgG^R dont l'affinité n'est pas altérée par la conjugaison à une enzyme (KOENIG, 1978). Cette supériorité du protocole ELISA indirect par rapport au protocole DAS-ELISA classique a également été mentionnée lors de la détection d'autres virus de plante (BAR-JOSEPH & MALKINSON, 1980 ; BARBARA & CLARK, 1982).

De plus, l'immunisation de poule rend possible la production de grandes quantités d'immunoglobulines. On note une spécificité des IgG^C vis-à-vis du témoin malade dès la sixième extraction (fig. 6). L'intensité de réaction augmente avec les lots ultérieurs et reste importante jusqu'à la vingtième extraction. Dans notre cas, près de 2,5 g d'immunoglobulines sont extraites à partir de 54 œufs d'une même poule, soit une moyenne de 46 mg d'IgG^C par œuf.

2. Détection des particules filamenteuses au niveau de différents organes de vignes

Le choix de l'organe prélevé et analysé est essentiel pour une détection fiable. Les feuilles de vigne permettent une bonne détection des plantes malades (fig. 7). L'utilisation de tige de vigne est également envisageable. Par contre, les tests sérologiques effectués sur les vrilles,

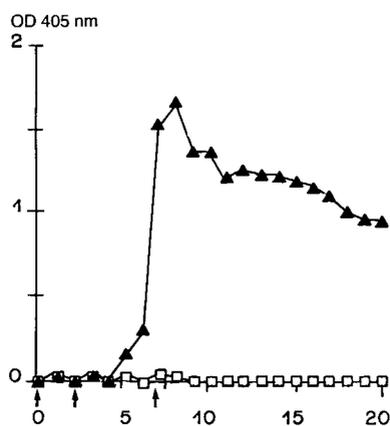


Figure 6

Efficacité en ELISA des IgG de poule en fonction de la chronologie de la ponte.

Les IgG^C sont incubées à raison de 5 µg/ml pendant 3 h à 37 °C. Après saturation (PBS-T, 1 p. 100 BSA) les jus bruts de vignes saines (Ts □) et malades (Tm ▲) sont distribués dans les puits et incubés la nuit à 4 °C. Les IgG^R (épuisées par 10 p. 100 de jus brut de vigne saine) sont utilisées au 1/1 000 et révélées par l'emploi de GAR-PAL (1/2 000). Substrat 1 h à 37 °C.

Les flèches indiquent les 3 immunisations.

Reactivity of yolk IgG depending on the timing of hen immunization and egg laying. Coating IgG^C (5 µg/ml) for 3 h at 37 °C. Saturation with PBS-T, BSA 1%. Leaf extracts of diseased (Tm ▲) and healthy (Ts □) grapevines were incubated overnight at 4 °C. IgG^R absorbed with healthy leaf extracts were incubated 2 h at 37 °C and revealed with GAR-PAL (1/2 000). Hydrolysis was measured after 1 h substrate incubation at 37 °C.

Arrows indicate the 3 immunizations.

les pétioles et les racines font apparaître une très faible différence de réaction entre les plantes saines et celles atteintes d'enroulement.

C. Utilisation de 4 sérums de différentes origines pour la détection sérologique de l'enroulement

Un lot d'immunoglobulines *GLRV1* du Dr GUGERLI est couplé à la phosphatase alcaline et utilisé dans un protocole DAS-ELISA (ELISA A).

Des immunoglobulines de lapin et d'anticorps couplés à la phosphatase alcaline provenant du laboratoire du Dr GONSALVES (ZEE *et al.*, 1987) sont également employés dans un protocole DAS-ELISA (ELISA B).

Des échantillons de feuilles de vignes cultivées en serre sont analysés dans ces deux protocoles ELISA (A et B) et dans le protocole ELISA indirect (ELISA C) décrit au paragraphe B.1. Certains échantillons sont également éprouvés avec des réactifs spécifiques de particules filamenteuses (GVA) (CONTI *et al.*, 1980) extraites de vignes atteintes de la maladie de la cannelure du tronc (ELISA D).

Cette étude sérologique est réalisée par l'analyse d'un total de 61 échantillons caractérisés dans nos collections. Les résultats sont représentés dans le tableau 1.

Parmi ces échantillons, 50 se sont révélés malades par l'indexage sur les variétés indicatrices *Vitis vinifera* « Pinot Noir » et *Vitis riparia* « Gloire » (WALTER & LEGIN, 1986).

Les résultats d'indexage des maladies de l'enroulement, des cannelures (stem pitting sur Kober 5BB) et du

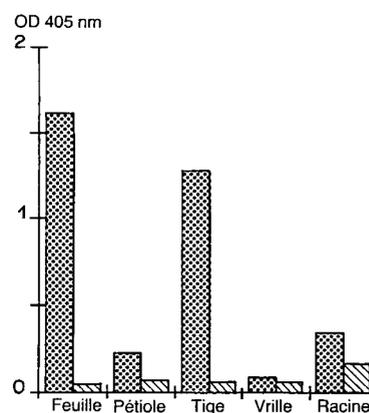


Figure 7

Comparaison de différents organes de vigne malade utilisés comme source d'antigène en ELISA.

Les extraits d'organes de vigne sont analysés dans un procédé ELISA indirect. Les conditions d'utilisation sont identiques à celles décrites fig. 1 (TS □, TM ▲).

Comparison of different grapevine organs used for the detection of diseased plants by ELISA. Extracts from each organ were analysed by indirect ELISA. Conditions of the test are mentioned in fig. 1 (TS □, TM ▲).

bois strié (corky bark sur LN 33) pour chaque échantillon sont rapportés dans le tableau 1.

32 échantillons malades réagissent simultanément dans les protocoles ELISA A et C. Parmi eux, seuls 4 échantillons réagissent également dans l'ELISA B. Parmi les 50 échantillons malades, 16 réagissent exclusivement dans le protocole B. Seuls 6 échantillons sur les 50 échantillons malades d'enroulement, ne réagissent dans aucun des trois protocoles ELISA.

Les 11 échantillons exempts d'enroulement réagissent négativement en ELISA.

Aucune corrélation stricte n'est observée entre la présence de la maladie des cannelures ou du bois strié et une réaction positive en ELISA.

Des essais complémentaires ont été entrepris sur du matériel de la variété Chardonnay provenant de parcelles expérimentales.

12 échantillons dont 10 montraient des symptômes visuels d'enroulement des feuilles ont été analysés en sérologie. Le tableau 2 illustre une corrélation parfaite entre la présence de symptômes d'enroulement et une réponse positive dans l'un des trois protocoles ELISA.

Toutes ces analyses sérologiques montrent la présence d'au moins 3 groupes distincts de vignes malades. L'un d'eux, le plus important (32/50), est constitué de vignes réagissant positivement dans l'ELISA A et le protocole ELISA indirect mis au point dans notre laboratoire (ELISA C). Le second groupe est constitué de vignes réagissant positivement dans l'ELISA B. 6 échantillons parmi les 50 vignes malades ne réagissant dans aucun des protocoles ELISA utilisés pourraient appartenir à un troisième groupe distinct des deux premiers.

Nous avons analysé en ELISA les feuilles d'un plant de Chardonnay malade d'enroulement. La réponse a été positive dans les trois protocoles A, B et C. Quelques fragments de bois de ce même pied de Chardonnay ont été indexés par greffage sur un plan sain de LN 33. Après plusieurs semaines de croissance, les feuilles de LN 33 sont éprouvées dans un test sérologique dont la

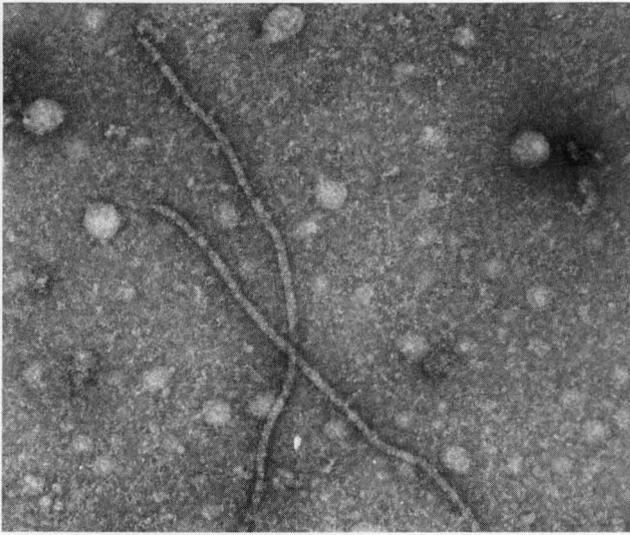


Photo 1

Particules virales de type clostérovirus isolées d'extraits foliaires de vignes atteintes d'enroulement (Pinot Noir). (Agrandissement $\times 135\ 000$.)

Closterovirus-like particles from leaf extracts of diseased grapevine (Pinot Noir). (Magnification $\times 135\ 000$.)

type clostérovirus présentes sur la grille, comme l'illustre la photo 2. Cette observation prouve la forte relation sérologique existant entre ces deux réactifs. Les anticorps *NY-1* et *GVA* ne permettent pas cette décoration.

Des comparaisons sérologiques entre les quatre types de réactifs ont été réalisées en ELISA avec du virus purifié *GLRV1*. Ces travaux confirment les observations de microscopie, à savoir la forte relation sérologique existant entre *GLRV1* et *GLRV1 Colmar*. Par contre, il n'existe aucune relation entre *GLRV1 Colmar* et les réactifs *GVA* et *NY-1*.



Photo 2

Particule virale de type clostérovirus décorée par des IgG^R . (Agrandissement $\times 135\ 000$.)

Closterovirus-like particle decorated with IgG^R . (Magnification $\times 135\ 000$.)

IV. DISCUSSION

La purification des particules virales de type clostérovirus à partir de vignes atteintes d'enroulement pose de nombreux problèmes. Ces particules virales ont tendance à s'adsorber au matériel végétal et leur aggrégation entre elles est fréquente (BAR-JOSEPH *et al.*, 1979). De surcroît, leur présence en faible quantité et leur fragmentation au cours des étapes de purification diminuent les succès escomptés (BAR-JOSEPH *et al.*, 1970 ; SMOOKLER & LOEBENSTEIN, 1974).

Malgré ces inconvénients, nous sommes en mesure d'isoler ces particules à partir de feuilles de vignes malades. La méthode de précipitation fractionnée au PEG rend possible l'élimination d'une partie importante d'extraits végétaux. L'emploi d'un gradient de densité de saccharose assure une séparation partielle des particules virales et des contaminants végétaux restants. Cependant une faible proportion de particules virales fragmentées ou associées à du matériel végétal est présente tout au long du gradient de saccharose. Ceci est illustré par une réaction faible en ELISA dans des zones de gradients voisines du pic principal de densité optique (fig. 2b). Des méthodes d'amélioration de la séparation des particules filamenteuses sont en cours d'étude, telles que l'utilisation de nouveaux supports de gradient de densité. Elles devraient permettre l'obtention de préparations virales de grande pureté, et par conséquent la production d'antisérums de grande spécificité.

L'emploi simultané d' IgG^C et d' IgG^R permet la réalisation d'un protocole ELISA indirect pour la détection des particules virales liées à l'enroulement. Ce protocole possède plusieurs avantages par rapport au système DAS-ELISA. L'affinité des immunoglobulines de lapin utilisées sous forme libre n'est pas altérée par le couplage à l'enzyme. Les immunoglobulines de chèvres marquées à la phosphatase alcaline sont disponibles commercialement et leur utilisation dans une étape supplémentaire induit une amplification de la réaction.

L'incubation des immunoglobulines de lapin en présence de jus brut de vigne saine constitue une méthode d'épuisement d'immunoglobulines simple et efficace. Des travaux similaires d'épuisement d'immunoglobulines par du jus brut de plante saine ont été décrits récemment pour le diagnostic sérologique du virus des taches annulaires nécrotiques du prunier (PNRSV) (STEIN *et al.*, 1987).

L'analyse sérologique de plus de 60 échantillons de vignes montre la présence de deux virus différents associés à l'enroulement de la vigne. Dans certains cépages, l'enroulement est strictement lié à l'un des virus. C'est notamment le cas des variétés de Klevener de Heiligenstein et Pinot Noir qui réagissent avec les réactifs *GLRV1* et *GLRV1 Colmar*.

La maladie particulière de l'enroulement à nervures jaunes observée dans le vignoble champenois n'est pas strictement associée à l'un des 2 virus. Ces symptômes particuliers de nervures jaunes pourraient être la manifestation d'un virus supplémentaire coexistant avec les particules filamenteuses liées à l'enroulement. Des études sont en cours pour vérifier cette hypothèse.

Globalement, sans tenir compte de la provenance des vignes analysées, les résultats montrent que la maladie de l'enroulement est liée au virus *GLRV1* dans près de 60 p. 100 des cas. Parallèlement les réactifs *NY-1*

produits par le Dr GONSALVES permettent la détection d'un deuxième groupe de vignes malades. A cet effet la purification de particules virales de type NY-1 et la production d'un antisérum spécifique sont à l'étude dans notre laboratoire.

Les résultats sérologiques décrits ci-dessus viennent confirmer les travaux antérieurs (GUGERLI *et al.*, 1984) relatant l'association de la maladie de l'enroulement de la vigne à la présence de particules virales de type clostérovirus.

Ainsi, ces travaux constituent une étape importante de la mise au point d'un système de diagnostic rapide de la maladie ; cette technique devant remplacer les travaux d'indexage actuellement nécessaires à son identification. Les observations d'indexage demandent non seulement la mise en place et l'entretien d'une pépinière de vignes sur une surface importante, mais également des notations de symptômes sur une période de 2 à 3 ans.

L'utilisation de tests sérologiques permet, d'une part, l'analyse d'échantillons de vignes de différentes provenances géographiques. Il est intéressant de vérifier l'existence de relations entre la présence des différentes particules filamenteuses associées à l'enroulement, l'origine géographique des plants malades, les formes variées d'enroulement et leur mode de transmission.

Toutes ces données nous permettront l'étude de l'étiologie de la maladie, mais également dans des cas précis une approche de son épidémiologie. C'est notamment le cas de l'enroulement à nervures jaunes caractérisé par une transmission très rapide dans le vignoble champenois (CAUDWELL *et al.*, 1983).

D'autre part des analyses sérologiques sur vignes malades soumises à la thérapie sont en cours. Elles devront permettre de vérifier le rôle de particules virales de type clostérovirus dans l'étiologie de la maladie de l'enroulement.

Reçu le 3 novembre 1987.

Accepté le 20 juin 1988.

REMERCIEMENTS

Nous remercions le Dr P. GUGERLI, le Dr E. LUISONI et le Dr D. GONSALVES pour les réactifs qu'ils nous ont fournis, le Dr M. WURTZ pour les clichés de microscopie électronique, enfin le Dr M. H. V. VAN REGENMORTEL pour sa contribution scientifique à la réalisation de cette communication.

Ces travaux ont été financés partiellement par une aide à l'innovation accordée par l'Agence Nationale de Valorisation de la Recherche (ANVAR).

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Avrameas S.**, 1969. Coupling of enzymes to proteins with glutaraldehyde. Use of the conjugates for the detection of antigens and antibodies. *Immunochemistry*, **6**, 43-52.
- Barbara D. J., Clark M. F.**, 1982. A simple indirect ELISA using F(ab')₂ fragments of immunoglobulin. *J. gen. Virol.*, **58**, 315-322.
- Bar-Joseph M., Malkinson M.**, 1980. Hen egg yolk as a source of antiviral antibodies in the enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA): a comparison of two plant viruses. *J. Virol. Methods*, **1**, 179-183.
- Bar-Joseph M., Loebenstein G., Cohen J.**, 1970. Partial purification of viruslike particles associated with the citrus tristeza disease. *Phytopathology*, **60**, 75-78.
- Bar-Joseph M., Garnsey S. M., Gonsalves D.**, 1979. The clostérovirus: a distinct group of elongated plant viruses. *Adv. Vir. Res.*, **25**, 93-168.
- Caudwell A., Larrue J., Badour C., Palge C., Bernard R., Leguay M.**, 1983. Développement épidémique d'un « enroulement à nervures jaunes » transmissible par la greffe, dans le vignoble de Champagne. *Agronomie*, **3**, 1027-1036.
- Clark M. F.**, 1981. Immunosorbent assays in plant pathology. *Ann. Rev. Phytopathol.*, **19**, 83-106.
- Conti M., Milne R. G.**, 1985. Clostérovirus associated with leafroll and stem pitting in grapevine. *Phytopath. med.*, **24**, 110-113.
- Conti M., Milne R. G., Luisoni E., Boccardo G.**, 1980. A clostérovirus from a stem-pitting diseased grapevine. *Phytopathology*, **70**, 394-399.
- Corbett M. K., Kasdorf G. G. F., Engelbrecht D. J., Wiid J.**, 1984. Detection of viral-like particles by electron microscopy of negatively stained extracts from grapevines. *South Afr. J. Ecol. Vitic.*, **5**, 43-49.
- Faoro F., Tornaghi R., Fortusini A., Belli G.**, 1981. Association of a possible clostérovirus with grapevine leafroll in northern Italy. *Riv. di Patol. Veget.*, S. IV, **17**, 183-189.
- Galet P.**, 1977. Enroulement. In « *Les maladies et les parasites de la vigne* », tome I. Imp. Le Paysan du midi, Montpellier, 633-643.
- Gerrie A. L., Clem L. W.**, 1969. Phylogeny of immunoglobulin structure and fonction. Immunoglobulins of the chicken. *J. Exp. Med.*, **130**, 1337-1351.
- Gugerli P., Brugger J. J., Bovey R.**, 1984. L'enroulement de la vigne: mise en évidence de particules virales et développement d'une méthode immuno-enzymatique pour le diagnostic rapide. *Rev. suisse Vitic., Arboric., Hortic.*, **16**, 299-304.
- Hardie G., Van Regenmortel M. H. V.**, 1977. Isolation of specific antibody under conditions of low ionic strength. *J. Imm. Methods*, **15**, 305-315.
- Koenig R.**, 1978. ELISA in study of homologous and heterologous reactions of plant viruses. *J. gen. Virol.*, **40**, 309-318.
- Legin R.**, 1972. Expérimentation pour étudier l'effet des principales viroses sur la végétation et la production de la vigne. *Ann. phytopathol.*, n° hors série, 49-57.
- Lister R. M., Hadidi A. F.**, 1971. Some properties of apple chlorotic leaf spot virus and their relation to purification problems. *Virology*, **45**, 240-251.
- Milne R. G., Conti M., Leseman D. E., Stellmach G., Tanne E., Cohen J.**, 1984. Clostérovirus-like particles of two types associated with diseased grapevines. *Phytopathol. Z.*, **110**, 360-368.
- Namba S., Yamashita S., Doi Y., Yora K., Terai Y., Yano R.**, 1979. Grapevine leafroll virus, a possible member of Clostéroviruses. *Ann. Phytopathol. Soc. Jpn.*, **45**, 497-502.
- Polson A., Von Wechmar M. B., and Van Regenmortel M. H. V.**, 1980. Isolation of viral IgY antibodies from yolks of immunized hens. *Immunol. Comm.*, **9**, 475-483.
- Rosciglione B., Gugerli P.**, 1986. Maladies de l'enroulement et du bois strié de la vigne: analyse microscopique et sérologique. *Rev. suisse Vitic., Arboric., Hortic.*, **18**, 207-211.
- Smookler M., Loebenstein G.**, 1974. Carnation yellow fleck virus. *Phytopathology*, **64**, 979-984.
- Stein S., Levy S., Loebenstein G.**, 1987. Detection of prunus necrotic ringspot virus in several rosaceous hosts by enzyme-linked immunosorbent assay. *Plant Pathol.*, **36**, 1-4.
- Tanne E., Sela I., Klein M., Harpaz I.**, 1977. Purification and characterization of a virus associated with the grapevine leafroll disease. *Phytopathology*, **67**, 442-447.
- Von der Brélie D., Nienhaus F.**, 1982. Investigations on the etiology of grapevine leafroll disease. *Z. Pflkrankh. Pflschut.*, **89**, 682-684.
- Walter B., Legin R.**, 1986. Connaissances actuelles sur les viroses de l'enroulement de la vigne. *Le Vigneron champenois*, **9**, 436-446.
- Wurtz M.**, 1983. *Contribution de la microscopie électronique à l'étude de la morphogénèse de la tête du bactériophage lambda*. Thèse Docteur es Sciences, Univ. Louis Pasteur Strasbourg, 177 pages.
- Zee F., Gonsalves D., Goheen A., Kim K. S., Pool R., Lee R. F.**, 1987. Cytopathology of leafroll-diseased grapevines and the purification and serology of associated clostérovirus particles. *Phytopathology*, **77**, 1427-1434.