



HAL
open science

Dosage immunoenzymatique (ELISA) du virus de la mosaïque du concombre II- Multiplication comparée du virus dans des melons sensibles et résistants

J.C. Devergne, Loïc Cardin, Michel Pitrat, Hervé Lecoq

► To cite this version:

J.C. Devergne, Loïc Cardin, Michel Pitrat, Hervé Lecoq. Dosage immunoenzymatique (ELISA) du virus de la mosaïque du concombre II- Multiplication comparée du virus dans des melons sensibles et résistants. *Agronomie*, 1984, 4 (2), pp.137-145. 10.1051/agro:19840204 . hal-02728329

HAL Id: hal-02728329

<https://hal.inrae.fr/hal-02728329>

Submitted on 2 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.

Dosage immunoenzymatique (ELISA) du virus de la mosaïque du concombre. II. Multiplication comparée du virus dans des melons sensibles et résistants

Jean-Claude DEVERGNE, Loïc CARDIN, Michel PITRAT (*) & Hervé LECOQ (**)

I.N.R.A., Station de Botanique et Pathologie végétale, 62, boulevard du Cap, B.P. 78, F 06602 Antibes

(*) Station d'Amélioration des Plantes maraichères

(**) Station de Pathologie végétale, Centre de Recherches d'Avignon, F 84140 Montfavet

RÉSUMÉ

Le dosage immunoenzymatique du virus de la mosaïque du concombre (CMV) dans le melon (*Cucumis melo* L.) est utilisé pour étudier comparativement la multiplication du virus dans une variété sensible (« Vedrantaï ») et une variété résistante (« SC »).

Le test ELISA (méthode « sandwich ») est réalisé sur des extraits obtenus par broyage des tissus infectés, dans une solution de citrate trisodique 0,5 M, clarifiés à volume égal par le chloroforme et stabilisés avec 0,4 p. 100 de formaldéhyde. Ces extraits (φ), dilués dans une solution de citrate trisodique 0,05 M (contenant 2 p. 100 de PVP et 0,2 p. 100 de BSA) ont un comportement identique à celui d'une préparation standard de CMV purifié stabilisé, utilisée comme référence (parallélisme des droites de régression dans une gamme de concentrations 30-250 ng/ml). Par comparaison, on peut donc estimer la quantité d'antigènes viraux présents dans les extraits (φ) et suivre ainsi avec précision, la multiplication du virus dans la plante. Compte tenu de la dilution à opérer sur les extraits (φ), ces estimations ne sont toutefois possibles qu'au delà d'une concentration minimum d'environ 0,5 μ g/ml.

Après infection expérimentale de melons par le CMV, la teneur en antigène des extraits (φ) de cotylédons, atteint une valeur maximum 6 à 7 jours après l'inoculation. Cette teneur peut être différente selon le type de melon étudié. Ainsi, pour la souche CMV-14 qui appartient au pathotype « SONG », elle est 50 fois moins élevée dans le melon « SC » que dans le melon « Vedrantaï ». Ce comportement préfigure l'évolution ultérieure de l'infection systémique. Alors que la souche CMV-14 se multiplie « normalement » dans le type « Vedrantaï » sensible, elle se stabilise à un niveau beaucoup plus bas (60 fois moins d'antigène dans les extraits (φ) de feuilles récoltées à J + 18) dans le type « SC » qui présente une résistance à la multiplication du virus.

Le dosage précoce de la teneur en antigènes viraux des extraits (φ) de cotylédons, 7 jours après leur inoculation, permet donc de trier les plantes qui possèdent cette résistance.

Dans ces conditions, la méthode ELISA convient parfaitement pour procéder à un « screening » végétal à grande échelle. On peut dès maintenant en prévoir de nombreuses applications, dans la recherche de différentes formes de « résistance » ou de « tolérance » au CMV, tant chez le melon que chez d'autres espèces maraichères.

Mots clés additionnels : *Cucumis melo*, *tri variétal*.

SUMMARY

Use of the ELISA test to estimate the concentration of cucumber mosaic virus (CMV). II. Comparison of virus multiplication in susceptible and resistant muskmelons.

A quantitative enzyme immunoassay has been used to study the multiplication of cucumber mosaic virus (CMV) in muskmelon (*Cucumis melo* L.).

The ELISA test (double antibody sandwich method) was performed with plant extracts obtained by grinding infected tissues in a 0.5 M citrate medium, clarified with V/V chloroform and stabilized with 0.4 % formaldehyde. These extracts (aqueous phases φ), when diluted in a 0.05 M citrate medium containing 2 % PVP and 0.2 % BSA, had the same behaviour as a standard preparation of stabilized purified CMV used as a reference (regression lines parallel within the concentration range 30-250 ng/ml).

Therefore, it was possible to estimate, by comparison, the amount of viral antigens in these (φ) extracts, and to follow accurately the viral multiplication in infected plants. On account of the dilution used for the (φ) extracts, these estimations were only possible if the virus concentration was above 0.5 μ g/ml.

After experimental infection of muskmelon by CMV, the antigen concentration in (φ) extracts from inoculated cotyledons reached a maximum value 6 to 7 days after inoculation. But the concentration was very different according to the type of muskmelon used.

So, the concentration of CMV-14 antigen (a CMV strain which belongs to the « SONG » pathotype) was 50 times lower in « SC » than in « Vedrantaï » muskmelon cultivar. This behaviour was in agreement with the

evolution of systemic infection in these plants. While CMV-14 strain multiplied normally in the « Vedrantaï » type which is susceptible, it remained, in contrast, at a much lower level in « SC » type which presents a partial resistance to the virus multiplication.

An estimation of the viral antigen content of (φ) extracts from cotyledons as early as 7 days after their inoculation allows one to recognize the plants showing such a « resistance ». The ELISA test can be used for systematic varietal screening at a large scale. Already, numerous applications of the method appear in the search for different kinds of « resistance » or « tolerance » against CMV, as well in muskmelon as in other vegetable crops.

Additional key words : *Cucumis melo*, *varietal screening*.

I. INTRODUCTION

Nous avons montré dans l'étude précédente (CARDIN *et al.*, 1984) qu'à la condition de respecter un protocole expérimental parfaitement défini, il existait, pour des concentrations en virus comprises entre 30 et 250 ng/ml, une relation linéaire entre la teneur en antigène d'une préparation purifiée du virus de la mosaïque du concombre (CMV-D) et la valeur de D.O. enregistrée lorsqu'on l'éprouve en ELISA. Dans la mesure où un extrait inconnu de plante virosée se comporte de la même façon, il est possible d'estimer la quantité de virus qu'il contient en le comparant à un extrait dosé, connu, servant de référence. Le test ELISA devient ainsi une méthode de dosage particulièrement utile pour l'étude des relations entre le virus et la plante-hôte.

Le virus de la mosaïque du concombre est responsable, tous les ans, de pertes importantes dans les cultures maraîchères du sud de la France (MESSIAEN *et al.*, 1963 ; QUIOT *et al.*, 1979). Parmi les espèces les plus affectées, le melon (*Cucumis melo* L.) est actuellement l'objet d'un programme de sélection qui utilise, entre autres types variétaux, des lignées présentant une résistance partielle à la multiplication du CMV (LECOQ *et al.*, 1982). L'étude de cette résistance suppose que l'on puisse estimer par un test simple et rapide la teneur en virus des différentes variétés de melons étudiées. Jusqu'alors, l'indexage biologique sur l'hôte hypersensible, *Vigna sinensis* L., était la seule méthode dont nous disposions (MARROU *et al.*, 1968 ; MARCHOUX, 1975). Malheureusement, son manque de reproductibilité d'un essai à l'autre la rendait difficilement exploitable à grande échelle.

Le dosage ELISA apporte une solution de rechange beaucoup plus rapide, la seule qui, à vrai dire, soit réellement applicable à une étude systématique des obtentions variétales impliquant un grand nombre d'échantillons.

II. MATÉRIEL ET MÉTHODES

A. Antigènes standards

Les 2 souches CMV-D et CMV-14 ont été employées comme antigènes de référence. La souche CMV-14, isolée en 1977 de melon (LEROUX *et al.*, 1979), appartient au pathotype « SONG », c'est-à-dire qu'elle peut infecter de façon systémique certaines variétés de melon (type « Songwhan Charmi » = « SC ») qui sont résistantes aux souches « communes » de CMV, comme par exemple à la souche CMV-D (RISSER *et al.*, 1977). Les 2 souches CMV-D et 14 appartiennent néanmoins au même sérotype et ne se différencient pas qualitativement l'une de l'autre dans les épreuves comparatives d'immunodiffusion double. Eprou-

vées en ELISA avec le même conjugué, elles donnent une réponse similaire, les droites de régression établies pour chacune d'elles étant parallèles, dans la gamme 30-250 ng/ml choisie. Dans chaque essai, nous avons toutefois utilisé comme standard une préparation de la même souche (D ou 14) que celle recherchée dans les melons indexés.

B. Echantillons de melon

Les plantes issues de semis (var. « Vedrantaï », sensible à toutes les souches de CMV, ou « SC » résistant) sont élevées en chambre climatisée à 25 °C sous un éclaircissement de 10 000 lux pendant 16 h/j. Le virus est inoculé mécaniquement sur les cotylédons, environ 12 j après le semis. Le test ELISA a lieu entre 2 et 8 j après l'inoculation, s'il est réalisé sur des extraits de cotylédons, et après 10 à 18 j, lorsqu'on éprouve les feuilles du sommet infectées de façon systémique.

Les échantillons sont préparés par broyage de 1 g de tissus prélevés sur plusieurs plantes (au minimum 5) dans 1 ml du milieu d'extraction dans le cas où le broyage est réalisé au mortier ou avec un broyeur à rouleaux, ou dans 2 ml dans le cas où l'on utilise un broyeur à billes.

Les milieux d'extraction et les modalités de clarification des extraits bruts seront indiqués dans les résultats.

C. Antisérums et test immunoenzymatique ELISA

Les antisérums, anticorps employés pour le « coating » et anticorps marqués à la phosphatase alcaline (conjugué), sont les mêmes que ceux utilisés dans l'article précédent. Les tests ELISA sont tous réalisés en cuvettes PAK (Gilford) selon le protocole expérimental précédemment décrit (CARDIN *et al.*, 1984).

III. RÉSULTATS

A. Préparation des extraits de melon

1. Choix des milieux d'extraction et de dilution

Dans une étude antérieure (DEVERGNE *et al.*, 1978), nous avons montré la supériorité du citrate trisodique (CIT) 0,5 M employé comme milieu d'extraction pour la détection sérologique du CMV dans différents tissus végétaux, quelle que soit la méthode utilisée : immunodiffusion double ou radiale, test ELISA. Le choix du citrate s'accompagne d'une clarification par le chloroforme, le test sérologique étant pratiqué sur la phase aqueuse (φ). De même, les premiers essais de dosage immunoenzymatique du CMV dans les feuilles de tabac inocuées (DEVERGNE & CARDIN, 1979) ont fait apparaître de très nettes différences selon les modalités d'extraction choisies : après une extraction (CIT),

l'antigène viral est détecté dès le stade J + 2 dans l'extrait (φ) dilué jusqu'au 1/100, alors qu'il ne l'est pas dans l'extrait brut non dilué obtenu directement après broyage dans un tampon phosphate (PH) 0,03 M.

Dans le cas du melon, les valeurs de D.O. sont toujours plus élevées pour les extraits (φ -CIT) que pour les extraits bruts (PH) en milieu PBS, bien que ce dernier tampon soit beaucoup plus souvent utilisé pour les tests ELISA. La clarification par le chloroforme permet en outre de stabiliser la phase aqueuse par le formaldéhyde, sans perte importante de virus, alors que l'addition de formol à l'extraction ou dans un extrait brut (CIT ou PH) s'accompagne généralement d'une baisse sensible des D.O. Or, la stabilisation de l'extrait de melon paraît logique puisque la préparation de CMV-D purifié servant de standard est elle-même traitée de la même manière.

En pratique, les tissus de melon sont broyés dans un milieu (CIT) 0,5 M contenant 0,1 p. 100 d'acide thioglycolique et la pulpe, traitée immédiatement à volume égal par du chloroforme froid, fournit, après une centrifugation de 10 mn à 4 000 g, une phase aqueuse (φ) qui est aussitôt stabilisée par le formaldéhyde à 0,4 p. 100.

Les dilutions ultérieures sont effectuées dans une solution de citrate 0,05 M contenant 2 p. 100 de polyvinylpyrrolidone (PVP, 30 000) et 0,2 p. 100 de sérum albumine bovine (BSA).

Les résultats de 4 essais comparatifs présentés sur le tableau 1, sont nettement en faveur des extraits (φ -CIT) pour lesquels les valeurs de D.O. à la dilution 1/80 sont presque le double de celles correspondant aux extraits (PH). La dilution des extraits (PH) dans le citrate 0,05M (essai II) n'améliore pas les résultats. De plus, les valeurs de D.O. relatives aux différentes dilutions des extraits (PH) sont très voisines jusqu'à la dilution 1/320 ; il n'existe apparemment pas de relation entre la dilution et la D.O., alors qu'une proportionnalité évidente apparaît au contraire pour les extraits (φ -CIT) dans la gamme 1/80-1/1280.

Une représentation graphique des valeurs de D.O. obtenues dans l'essai IV est présentée sur la figure 1, en comparaison avec celles relatives à une préparation standard de CMV-D purifié, déposée dans la même cuvette. Le comportement de l'extrait (φ -CIT) est identique à celui de la préparation témoin, alors que celui de l'extrait (PH) est tout à fait différent dans la gamme de dilutions choisie.

La droite de régression établie pour le standard entre 30 et 250 ng/ml détermine une zone de dosage comprise entre 0,140 et 1,132 de Δ D.O. (60-15 mn). Dans cette zone, les 4 dilutions (1/160 à 1/1280) de l'extrait (φ -CIT) donnent des valeurs de Δ D.O. qui varient linéairement avec le logarithme de la concentration (tabl. 2A). Les 2 droites de régression de cet extrait et du standard sont parallèles, ce qui nous permet de calculer la teneur en antigène de la phase aqueuse (φ) en utilisant les moyennes de la droite de régression (tabl. 2B). Les calculs donnent des estimations identiques (48,3 ng/ml de la phase aqueuse initiale) pour les 2 dilutions 1/320 et 1/640 dont les Δ D.O. sont situées au milieu de la zone de dosage. La valeur fournie par la dilution 1/160 est légèrement sous-estimée. Dans cet essai, la dilution 1/1280 doit être rejetée bien que théoriquement située dans la zone de dosage. La valeur de Δ D.O. correspondante (Δ D.O. = 0,262) est probablement trop faible et il aurait été souhaitable de prolonger légèrement la durée d'hydrolyse du substrat afin que la limite inférieure de la zone de dosage (Δ D.O. = 0,140) soit un peu plus élevée.

2. Modalités du broyage

La quantité de virus que l'on peut espérer extraire de la plante infectée ne dépend pas uniquement du milieu d'extraction, mais aussi de la technique employée pour le broyage. La plupart des résultats présentés dans ce travail ont été obtenus avec des extraits préparés par broyage manuel au mortier. Comparée au broyage mécanique, cette méthode n'est peut-être pas la plus performante ni la plus reproductible.

TABLEAU 1

Comparaison des valeurs de Δ D.O. (60-15 mn) enregistrées pour différentes dilutions d'extraits ⁽¹⁾ de melon obtenus après broyage dans un milieu (PH) ou (CIT). (Moyennes de triplets en cuvette PAK).

Comparative values of Δ O.D. (60-15 min) recorded for serial dilutions of muskmelon extracts prepared by grinding in phosphate (PH) or citrate (CIT) buffer (Mean values of triplets in cuvette PAK).

Essai	Tampons		Δ D.O. (60-15 mn \times 10 ³) pour chaque dilution de l'extrait ⁽¹⁾						
	Extraction	Dilution ⁽²⁾	1/20	1/40	1/80	1/160	1/320	1/640	1/1280
I	PH 0,03	PH 0,03	675	775	735	713	600	354	—
	CIT 0,5	(φ) CIT 0,05	—	—	1 377	1 184	908	587	436
II	PH 0,03	CIT 0,05	812	979	842	782	596	264	—
	CIT 0,5	(φ) CIT 0,05	—	—	1 487	1 211	961	618	490
III	PH 0,03	PH 0,03	734	770	748	693	646	407	—
	CIT 0,5	(φ) CIT 0,05	—	—	1 415	1 210	854	636	352
IV	PH 0,03	PH 0,03	711	735	762	723	569	374	—
	CIT 0,5	(φ) CIT 0,05	—	—	1 365	1 086	827	492	262

⁽¹⁾ Extrait clarifié après broyage en phosphate 0,03 ou phase aqueuse (φ) après broyage en citrate 0,5 et clarification par le chloroforme.

⁽²⁾ Tampons de dilution additionnés de 2 % de PVP et 0,2 % de BSA.

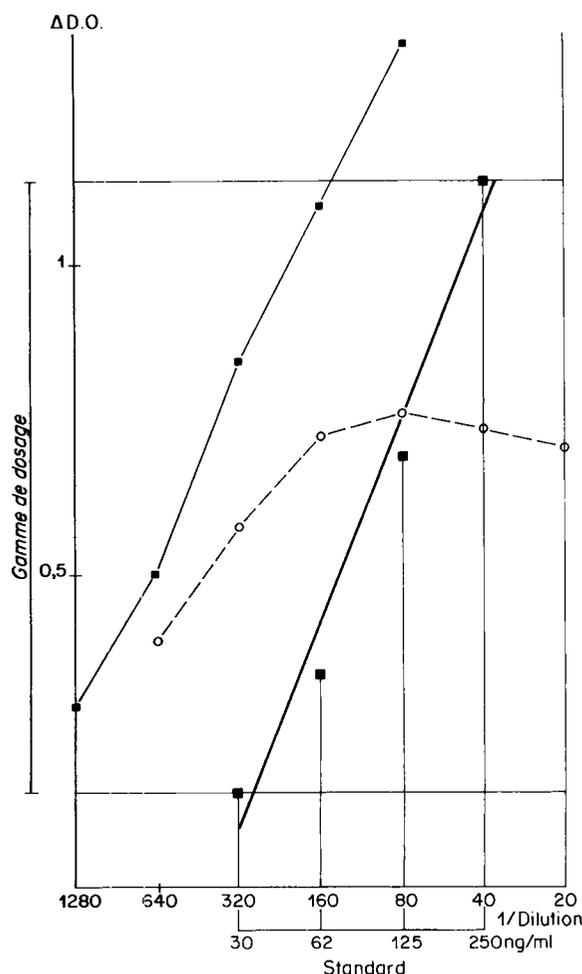


Figure 1

Comparaison des courbes de réponse d'un extrait (PH) et d'un extrait (φ-CIT) de cotylédons de melon éprouvés en ELISA, 6 jours après leur inoculation par le CMV-D.

Comparative curves fitted to data of serial dilutions of "phosphate" and "φ-citrate" extracts of muskmelon cotyledons tested by ELISA, 6 days after their inoculation with CMV-D.

—■— Extrait (φ-CIT), (φ)-citrate extract

---○--- Extrait (PH), Phosphate extract.

—■— Droite de régression de la préparation standard dans la gamme de concentration 30-250 ng/ml.
Regression line of the standard CMV preparation within the concentration range 30-250 ng/ml.

Sur le tableau 3, nous avons comparé, dans 2 essais, l'efficacité de 3 types de broyage utilisant le mortier, le broyeur à rouleaux et le broyeur à billes, pour l'extraction du CMV dans les cotylédons de melons infectés au stade J + 8. Les Δ D.O. (60-15 mn) sont relatives à des extraits (φ-citrate) dilués au 1/320 : il s'agit de valeurs moyennes calculées à partir de 5 broyages, c'est-à-dire 15 mesures de Δ D.O., chaque extrait étant déposé dans 3 puits (triplet) d'une même cuvette PAK.

La comparaison des 3 types de broyage entre eux (étude de variance inter-broyages) ne fait pas apparaître de différence significative dans les 2 essais analysés. Les 3 modalités étudiées auraient donc globalement la même efficacité pour extraire le virus des tissus infectés.

En revanche, l'analyse de variance intra-broyage montre qu'il existe une certaine variabilité dans les 5 extraits (φ) obtenus par broyage au mortier. La valeur du rapport F est significative au seuil 0,05 dans l'essai I et hautement significative au seuil 0,01 dans l'essai II. Dans les 2 cas, une

comparaison des moyennes (test de NEWMANN & KEULS) indique qu'un broyat est significativement différent des 4 autres.

Cette variabilité n'apparaît pas lorsqu'on utilise soit le broyeur à billes, soit le broyeur à rouleaux. Un broyage mécanique est donc préférable au broyage manuel, si l'on désire obtenir une bonne reproductibilité, ce qui est particulièrement important pour un dosage. Remarquons également que le broyage au mortier est long et fastidieux lorsqu'on doit indexer un grand nombre d'échantillons.

3. Comportement des extraits de melon sain

Dans nos conditions expérimentales, les valeurs de D.O. fournies par les extraits (φ-CIT) de melon sain ne sont guère plus élevées que celles du tampon citrate lui-même. Pour l'extrait φ/10, la différence devient tout à fait négligeable. On vérifie également qu'une préparation standard de CMV-D purifiée, stabilisée, diluée dans un extrait φ/10 de melon sain donne des D.O. quasiment identiques à celles obtenues lorsque la dilution est effectuée dans le seul tampon citrate (dans les 2 cas, le milieu de dilution contenant 2 p. 100 de PVP et 0,2 p. 100 de BSA). Il n'y a donc pas, à vrai dire, de « bruit de fond » imputable à une réaction non spécifique entre le conjugué et les constituants normaux de l'extrait (φ) de melon.

En début d'incubation, la D.O. des témoins citrate ou φ/10 de melon sain est très faible, de l'ordre de 0,025 ; elle évolue lentement au cours de l'hydrolyse du substrat mais ne dépasse généralement pas 0,1 au moment choisi pour la lecture. Si l'on prend en considération les Δ D.O., il faut théoriquement retrancher aux valeurs de Δ D.O. des échantillons, celles correspondant aux témoins, soit environ 0,07. Pour le dosage, les estimations étant faites par comparaison avec une préparation standard diluée dans le même tampon, on néglige en fait cette correction.

4. Conservation des extraits

A la fois pour des raisons de commodité et pour disposer d'estimations simultanées rigoureusement comparables, on peut être amené à regrouper dans un même test plusieurs échantillons récoltés à des dates différentes. Dans ce cas, il faut conserver soit les échantillons, soit les extraits à doser.

En raison de l'instabilité du CMV, il est fortement déconseillé de préparer les extraits trop longtemps avant d'effectuer le test ELISA. Dans un extrait non stabilisé, dont la teneur en virus avait été estimée le jour même de l'extraction à 200 ng/ml, il ne reste plus assez de virus après 7 j de conservation à 4 °C pour procéder au dosage. Cette perte est très rapide et peut atteindre 60 à 80 p. 100 dans les premières 24 h, aussi bien en milieu (CIT) qu'en milieu (PH). La stabilisation de la phase aqueuse (φ-CIT) par le formaldéhyde réduit cette perte sans l'éliminer. Elle est encore de l'ordre de 40 p. 100 dès le premier jour de conservation ; mais, par la suite, les D.O. restent beaucoup plus stables.

Pour les essais uniquement comparatifs, n'exigeant pas des estimations pondérales, on pourrait à la rigueur préparer les extraits la veille du test. La perte en virus étant indépendante de la concentration initiale, les différences entre les échantillons subsistent. C'est le cas du tri des variétés sensibles et résistantes de melon, que nous étudions plus loin.

Au contraire, dans les essais quantitatifs nécessitant une évaluation précise de la teneur en virus (dynamique de l'infection virale par exemple), il convient de travailler uniquement avec des extraits fraîchement préparés.

TABLEAU 2

*Dosage du CMV-D dans un extrait (φ) de cotylédons de melon infectés à J + 6 (Essai IV, Tableau I).
Estimation of CMV-D concentration in extracts (φ) of muskmelon cotyledons, 6 days after infection (Test IV, Table I).*

*A. Parallélisme des droites de régression de l'extrait et du standard.
Parallelism of the regression lines fitted for a muskmelon extract and the CMV standard preparation.*

Extrait	Droite de régression			Parallélisme (t)
	F	Pente	Ordonnée à l'origine	
CMV-D purifié standard gamme 30-250 ng/ml	0,948 ^{NS}	480,04	- 1 578,89	1,198 ^{NS}
Extrait (φ) de melon ⁽¹⁾ gamme $\varphi/160$ - $\varphi/1 280$	1,011 ^{NS}	404,78	- 586,20	

(¹) Après broyage en milieu CIT 0,5M et dilution en CIT 0,05M.

*B. Estimation de la teneur en virus.
Estimation of virus content.*

Extrait	CMV-D 250 ng	Extrait (φ) de melon				CMV-D 30 ng
		$\varphi/160$	$\varphi/320$	$\varphi/640$	$\varphi/1 280$	
Δ D.o. $\times 10^3$ (60-15 mn)	1 132	1 086	827	492	262	140
Estimation (μ g/ml) ⁽¹⁾	—	41,4	48,3	48,3	59,8	—

(¹) Rapporté à l'extrait (φ) non dilué.

TABLEAU 3

*Comparaison de trois modalités de broyage.
 Δ D.o. (60-15 mn) enregistrées pour des extraits $\varphi/320$ en milieu citrate 0,05M.
Cotylédons de melon infectés au stade J + 8.*

*Comparison of three extraction methods of CMV from muskmelon cotyledons.
 Δ O.D. (60-15 mn) recorded for aqueous phase (φ) diluted 1/320 in 0.05M citrate buffer.*

Essai	Modalités du broyage	Moyenne (¹) Δ D.o. $\times 10^3$ (X)	Coefficient (¹) de variation (CV)	Etude de variance (²)	
				Intra-broyage (F)	Inter-broyage (F)
I	Mortier	643	10,1	4,47 (*)	2,81 ^{NS}
	Br à rouleaux	637	8,2	2,69 ^{NS}	
	Br à billes	565	9,6	1,36 ^{NS}	
II	Mortier	572	18,0	7,79 (**)	1,28 ^{NS}
	Br à rouleaux	674	4,2	2,28 ^{NS}	
	Br à billes	674	1,9	0,54 ^{NS}	

(¹) Moyennes \bar{X} (Δ D.o.) et coefficients de variation Cv calculés pour 5 broyages (3 mesures par broyage).

(²) Rapports de variance F ; (**) hautement significatif au seuil 0,01 ; (*) Significatif au seuil 0,05 ; ^{NS} : non significatif.

La conservation des échantillons sous forme de fragments de tissus végétaux non broyés est sans doute possible, du moins pendant quelques jours. Cet aspect mériterait d'être étudié.

B. Etude cinétique de l'infection du melon « Vedrantaï » par la souche CMV-D

Lorsque le virus est généralisé dans les tissus de melon, la D.O. fournie par l'extrait phase aqueuse (φ) est toujours beaucoup plus élevée que celle correspondant à la limite supérieure du dosage (250 ng/ml de la préparation standard). Il faut donc diluer en conséquence l'extrait (φ) pour que la D.O. soit comprise dans cette zone. Généralement, 3 dilutions, parfois 4 (comme dans l'exemple analysé précédemment) peuvent être utilisées pour estimer la teneur en antigène. Les dilutions qui donnent des valeurs de D.O. situées au milieu de la zone de dosage doivent être choisies préférentiellement car les plus fiables : d'ailleurs, 2 dilutions successives conduisent à des estimations très voisines, sinon identiques. Les évaluations faites à partir de D.O. extrêmes sont un peu moins précises. Il y a souvent surestimation lorsque les valeurs de D.O. sont très faibles. La valeur limite de 30 ng a néanmoins été conservée pour établir la droite de régression à partir de 4 concentrations.

Au-dessous de cette limite, on ne peut plus doser l'antigène présent dans l'extrait (φ) bien qu'il y soit détecté par ELISA.

Toutefois, il semble que la dilution minimum de l'extrait (φ) utilisable pour le dosage soit le 1/10. En effet, lorsqu'il y a très peu de virus, on constate souvent que les D.O. enregistrées à cette dilution sont légèrement supérieures à celles des mêmes extraits dilués seulement au 1/2 ou au 1/5. Ainsi, la limite serait de 0,3 $\mu\text{g/ml}$ rapportée à la phase aqueuse non diluée. En pratique, le seuil au-dessous duquel les estimations ne présentent plus une précision suffisante est de l'ordre de 0,5 $\mu\text{g/ml}$.

Le test ELISA détecte l'antigène CMV-D dans les extraits $\varphi/10$ de cotylédons de melon « Vedrantaï » dès le lendemain de leur inoculation, mais les D.O. sont encore trop basses pour pouvoir le doser. Il faut généralement attendre le stade J + 3 pour estimer la teneur en antigène qui est alors de 1 ou 2 $\mu\text{g/ml}$ (phase aqueuse initiale non diluée). La limite de détection est à ce moment située entre le 1/80 et le 1/160.

Jusqu'au stade J + 5, la teneur en virus augmente mais dépasse rarement 10 $\mu\text{g/ml}$. A partir du 6^e j qui suit l'inoculation, on assiste à une brusque augmentation de la quantité d'antigène qui atteint 50 ou même 100 $\mu\text{g/ml}$ entre les stades J + 6 et J + 9. Au maximum de concentration, il arrive que le virus soit encore détecté dans l'extrait $\varphi/20\ 000$. On utilise généralement pour le dosage les dilutions $\varphi/160$ à $\varphi/640$. Au-delà du stade J + 9, la teneur en virus diminue.

Dans les premières feuilles infectées de façon systémique, la concentration en antigène est, dès le stade J + 6, sensiblement plus forte que dans les cotylédons. Exceptionnellement, la limite de dilution de l'extrait (φ) atteint le 1/80 000. On observe à ce stade des différences parfois très nettes entre les estimations faites pour plusieurs échantillons appartenant au même essai. Dans des conditions d'échantillonnage identiques, cette variabilité semble beaucoup plus importante dans les premières feuilles que dans les cotylédons, ce qui pourrait indiquer que, dans certaines plantes, l'infection systémique est retardée.

Dans les feuilles de l'apex au stade J + 8, on retrouve aussi plus ou moins de virus selon les plantes inoculées.

Mais à partir du 10^e j, la teneur en antigène se stabilise ; elle est souvent moins élevée que dans les premières feuilles ou même que dans les cotylédons au stade J + 7.

Les mesures effectuées inter-essais montrent une assez grande variabilité dont la cause principale doit être recherchée dans l'utilisation de différents inoculums imparfaitement standardisés (les conditions de culture des plantes et les modalités d'échantillonnage étant par ailleurs identiques).

Malgré cela, la cinétique de l'infection virale paraît constante : on note toujours un maximum de concentration en antigène dans les cotylédons infectés depuis 6-8 j, puis un peu plus tard des quantités très élevées en virus dans les premières feuilles.

Au fur et à mesure que l'infection systémique progresse, les différences dans le comportement individuel des plantes inoculées paraissent s'accroître.

C. Etude comparative de la multiplication de la souche CMV-14 dans deux types de melon

La souche CMV-14, qui appartient au pathotype « Song », infecte de façon systémique certaines variétés de melon résistantes aux souches communes de CMV. Toutefois, le virus s'y multiplierait beaucoup moins que dans les variétés sensibles. Afin de mettre en évidence cette résistance partielle à la multiplication du virus, nous avons comparé la teneur en antigène viral des extraits (φ) préparés à partir de 2 types de melon sensible « Vedrantaï » et « résistant » « SC » entre 3 et 18 j après leur inoculation.

Dans les cotylédons inoculés de la variété sensible (tabl. 4), on peut estimer par ELISA la teneur en virus, dès le 1^{er} prélèvement effectué à J + 3, à environ 1 $\mu\text{g/ml}$ (rapporté à la phase aqueuse initiale non diluée). La concentration en antigène augmente ensuite régulièrement surtout à partir du 6^e j pour atteindre un maximum de 60 $\mu\text{g/ml}$ au stade J + 7. Dans les cotylédons de la variété « résistante » « SC », infectés à la même date à l'aide du même inoculum, la présence de l'antigène viral est également détectée dès le stade J + 3, mais seulement dans l'extrait $\varphi/10$. Jusqu'au stade J + 6, la teneur en virus reste inférieure au seuil de 0,5 $\mu\text{g/ml}$, au-dessous duquel le dosage ELISA n'est plus possible. Comme dans la variété sensible, il semble qu'un maximum de concentration soit atteint à J + 7 ; la teneur en virus peut alors être estimée à 1,2 $\mu\text{g/ml}$, soit 50 fois moins que dans les cotylédons de melon « Vedrantaï ».

Pour étudier l'infection systémique, nous avons procédé à 2 prélèvements, l'un au niveau des 2 premières feuilles, l'autre au niveau de l'apex (tabl. 5).

C'est dans les 2 premières feuilles de la variété sensible que nous trouvons les concentrations les plus élevées en antigène viral : environ 500 $\mu\text{g/ml}$ dans les extraits (φ) indexés à J + 8, soit 10 fois plus que dans les cotylédons. Au niveau de l'apex, il y a beaucoup moins de virus (190 $\mu\text{g/ml}$ seulement). Entre le 10^e et le 18^e j après l'inoculation, la concentration diminue aussi bien dans les premières feuilles que dans celles du sommet. Dans l'essai analysé, la teneur en antigène n'est plus que de 23 $\mu\text{g/ml}$ dans l'extrait (φ) préparé avec les feuilles du sommet prélevées à J + 18.

Le melon « SC » a un comportement totalement différent. Dans les premières feuilles, le virus ne se trouve jamais en quantité suffisante pour y être dosé (bien que l'antigène soit détecté dans les extraits $\varphi/10$) et, dans les feuilles de l'apex, la teneur varie de 2 à 6 $\mu\text{g/ml}$, se maintenant à un niveau nettement plus bas que celui atteint dans la variété de melon sensible.

TABLEAU 4

Dosage immunoenzymatique de la souche CMV-14 dans les cotylédons de melon « Vedrantaïs » et « SC » entre 3 et 8 j après leur inoculation. Estimation of antigen concentration in muskmelon cotyledons cv. "Vedrantaïs" and "SC" inoculated with CMV-14. Viral multiplication between 3 and 8 days after inoculation.

Variété de melon	Echantillon	Date du prélèvement					
		J + 3	J + 4	J + 5	J + 6	J + 7	J + 8
Vedrantaïs (type Charentais)	Cotylédons	1,1 ^(a) (10) ^(b)	3 (10-40)	8 (20-40)	45 (160-640)	60 (160-320)	55 (160-320)
SC lignée (PI 161375)	Cotylédons	+ ^(c)	+	+	+	1,2 (10)	++ ^(d)

^(a) Concentration exprimée en µg par ml de la phase aqueuse initiale ; estimation faite à partir de 2 ou 3 dilutions de la phase aqueuse.

^(b) Inverses des dilutions de la phase aqueuse situées dans la zone de dosage.

^(c) Virus détecté dans la phase aqueuse diluée au 1/10 (+) et au 1/20 (++) mais ne pouvant pas être dosé.

TABLEAU 5

Dosage immunoenzymatique de la souche CMV-14 dans les feuilles de melon « Vedrantaïs » et « SC », infectées systématiquement. Multiplication du virus entre 7 et 18 j après l'inoculation.

Estimation of antigen concentration in muskmelon cv. "Vedrantaïs" and "SC" systemically infected by CMV-14. Viral multiplication between 7 and 18 days after inoculation.

Variété de melon	Echantillon	Date de prélèvement					
		J + 7	J + 8	J + 10	J + 12	J + 14	J + 18
Vedrantaïs (type Charentais)	Premières feuilles	NT	480 ^(a) (1 280-5 120) ^(b)	400 (640-2 560)	150 (640-2 560)	280 (640-1 280)	NT
	Apex	55 (160-320)	190 (320-1 280)	110 (320-640)	60 (160-640)	30 (80-160)	23 (80-160)
« SC » (lignée PI 161375)	Premières feuilles	NT	- ^(c)	+ ^(c)	+	+	NT
	Apex	5 (20-40)	5 (10-20)	6 (20-40)	++ ^(d)	2 (10-20)	5 (10-20)

^(a) Concentration exprimée en µg par ml de la phase aqueuse initiale ; estimation faite à partir de 2 ou 3 dilutions de la phase aqueuse.

^(b) Inverses des dilutions de la phase aqueuse situées dans la zone de dosage.

^(c) ^(d) Virus détecté dans la phase aqueuse diluée au 1/10 (+) et au 1/20 (++) mais ne pouvant pas être dosé ; ^(c) (-) virus non détecté ; NT non testé.

IV. DISCUSSION ET CONCLUSION

La méthode de dosage immunoenzymatique que nous proposons utilise comme références des préparations standards de virus purifié CMV, stabilisées par le formaldéhyde (CARDIN *et al.*, 1984). Les extraits des plantes éprouvées sont également stabilisés.

Nous ferons, à cet égard, 2 remarques importantes :

1) La stabilisation des jus de melon ne peut s'opérer que sur des extraits (φ-citrate) clarifiés par le chloroforme, seules conditions dans lesquelles le comportement de l'extrait éprouvé est analogue à celui de la préparation de référence. Cette clarification par le chloroforme ne permet évidemment pas de préserver la totalité du virus. Il serait donc inexact de rapporter les estimations pondérales de l'antigène présent dans la phase aqueuse (φ) à celles du virus qui existe réellement dans la plante. On peut seulement penser que, la technique d'extraction et de stabilisa-

tion étant toujours la même, les pertes occasionnées sont dans tous les cas identiques. De ce fait, le dosage proposé n'a qu'une valeur comparative.

2) Malgré le traitement des extraits (φ) par le formol, il n'est pas certain qu'ils ne contiennent que la forme stabilisée du virus. Dans les épreuves sérologiques d'immunodiffusion en gélose, la dégradation du virus se traduit par l'apparition d'une ligne de précipitation de type « antigène soluble » que l'on observe aussi bien avec les préparations de virus purifié non stabilisées, qu'avec les jus bruts de plantes infectées (SCOTT, 1968 ; DEVERGNE & CARDIN, 1970). Il est possible que cet antigène soluble préexiste dans la plante ou apparaisse dès le début de l'extraction. Dans ce cas, la stabilisation des extraits de melon n'intervenant qu'après leur clarification par le chloroforme, la présence d'un antigène soluble ne peut être complètement exclue. Même en trop faible quantité pour être détecté en milieu gélosé, cet antigène peut fort bien être reconnu en ELISA.

Nous avons vérifié que les anticorps utilisés pour le « coating » et le « conjugué » pouvaient détecter en ELISA non seulement le virus purifié stabilisé, mais aussi la protéine obtenue par dégradation expérimentale du virus par les sels (CaCl_2) ; cette protéine, sérologiquement identique à l'antigène soluble qui apparaît spontanément dans les extraits non stabilisés, possède en effet des motifs communs avec le virion intact (métatopes).

On peut donc se demander si le dosage ELISA tel que nous l'avons pratiqué ne fait pas intervenir les 2 types d'antigène, lorsque ceux-ci existent en mélange dans les extraits de melon.

Un dosage spécifique de chacun de ces 2 antigènes est cependant possible. Nous avons montré que certains motifs antigéniques (néotopes) étaient liés à la structure intacte du virus (DEVERGNE & CARDIN, 1970). On pourrait donc préparer des anticorps qui leur seraient rigoureusement spécifiques en épuisant les sérums par l'antigène soluble correspondant à la souche étudiée. La précision du dosage en serait certainement améliorée, la préparation servant de référence étant exclusivement du virus stabilisé.

Inversement, la préparation d'un sérum correspondant à l'antigène soluble obtenu expérimentalement (par dégradation par les sels) pourrait, après épuisement par le virus stabilisé, permettre le seul dosage de l'antigène soluble. La préparation d'anticorps monoclonaux spécifiques de certains néotopes de la particule intacte ou de cryptotopes de l'antigène soluble peut aussi être envisagée. Une étude cinétique de l'apparition de ces 2 antigènes dans les plantes inoculées aiderait certainement à la compréhension des phénomènes cycliques observés au cours de l'infection (MARROU & MIGLIORI, 1968).

En dépit de ces réserves, le test ELISA est actuellement la seule méthode qui permette d'estimer rapidement la quantité d'antigènes viraux (particules intactes ou antigène soluble) présents dans la phase aqueuse préparée à partir de végétaux virosés. On peut considérer que ces estimations reflètent assez bien la multiplication du virus dans ces tissus. Dans le cas du melon, l'évolution de la teneur en antigènes des extraits (φ), au cours de l'infection par le CMV, confirme d'ailleurs les résultats obtenus précédemment avec d'autres méthodes (indexage biologique, transmission par vecteur) ou avec d'autres plantes (LECOQ *et al.*, 1979).

L'étude comparative des melons « Vedrantaï » et « SC », infectés par la souche CMV-14, met parfaitement en évidence le phénomène de « résistance » soupçonné chez le type « SC ». Dix-huit jours après l'inoculation, la teneur en antigènes des extraits (φ) de feuilles de l'apex est 60 fois moins élevée que dans la variété sensible. Au niveau des premières feuilles, les différences sont encore plus marquées : il faut diluer l'extrait (φ) au 1/2 560 pour doser le virus dans le melon « Vedrantaï » alors que, dans le melon « SC », le virus n'est même pas détecté dans la phase aqueuse diluée au 1/10.

Cette différence se manifeste aussi dans les cotylédons inoculés. Au stade J + 7, il y a 50 fois plus de virus dans les extraits (φ) du type « sensible » que dans ceux du type « résistant ». Même en tenant compte des imperfections de la méthode, cette différence est tout à fait significative. Ainsi, l'épreuve sur cotylédons permet de trier quelques

jours après leur inoculation, les lignées présentant une « résistance » à la multiplication virale, puisqu'il y a corrélation entre la teneur en antigènes dès le stade cotylédonaire et le développement ultérieur de l'infection systémique. Ce test précoce a de plus l'avantage de faire appel à un matériel végétal jeune beaucoup plus homogène que les tissus de plantes âgées pour lesquelles il serait plus difficile d'obtenir une parfaite régularité de croissance.

Lorsqu'il s'agit de comparer le comportement de différents organes d'une seule plante ou celui de plusieurs plantes infectées simultanément à l'aide du même inoculum, l'interprétation des résultats du dosage ELISA ne pose pas de problèmes particuliers. C'est le cas de l'exemple étudié avec la souche CMV-14. Mais lorsqu'on désire comparer entre elles des plantes inoculées à différentes périodes, il faut s'assurer que les inoculums employés sont comparables. Dans le cas où la souche CMV est toujours la même, il suffit de standardiser avec soin la préparation de l'inoculum et la méthode d'inoculation. Dans le cas où plusieurs souches sont en cause, il est alors nécessaire d'inclure dans les tests autant de préparations standards qu'il y a de souches étudiées. La méthode ELISA étant très spécifique, les comportements de plusieurs isolats éprouvés avec un seul conjugué sont en effet très différents (DEVERGNE *et al.*, 1981).

Le protocole expérimental du dosage ELISA s'en trouve certes alourdi, mais la méthode reste néanmoins plus facile et plus rapide que le dosage biologique qui d'ailleurs, dans les mêmes conditions, présente aussi les mêmes inconvénients.

D'ores et déjà, les applications du dosage immunoenzymatique apparaissent nombreuses dans toute étude ayant pour but la sélection de plantes présentant une résistance ou une tolérance à la multiplication du CMV.

Chez le melon, la possibilité de suivre simultanément la cinétique de l'infection virale dans un grand nombre d'individus permet d'envisager un tri systématique des variétés et de révéler d'autres manifestations de tolérance similaires ou même éventuellement plus efficaces que celles décelées chez la lignée « SC ». Des résultats très encourageants ont déjà été obtenus dans ce sens. D'autre part, l'étude des conditions dans lesquelles ces phénomènes s'expriment chez les descendants issus de croisements entre lignées « sensible » et « résistante », vis-à-vis de différentes souches de CMV, ou encore dans des plantes soumises à des traitements susceptibles de modifier leur comportement, apportera des informations précieuses sur la nature (hérédité, spécificité) et le mécanisme de ces formes de résistance.

Plus généralement, l'application du test ELISA au dosage du CMV dans différentes plantes devrait rendre beaucoup plus facile la recherche et l'exploitation de « résistances » dans d'autres espèces maraîchères comme le piment ou la tomate, chez lesquelles des manifestations du même type ont parfois été observées (MARCHOUX *et al.*, 1967, 1982 ; POCHARD, 1977), mais dont l'étude était, jusqu'à présent, beaucoup plus laborieuse faute de disposer d'un outil rapide et fiable de sélection.

Reçu le 24 mars 1983
 Accepté le 14 septembre 1983.

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Cardin L., Devergne J. C., Pitrat M.**, 1984. Dosage immunoenzymatique (ELISA) du virus de la mosaïque du concombre. I. Aspect méthodologique. *Agronomie*, **4** (2), 125-135.
- Devergne J. C., Cardin L.**, 1970. Etude sérologique comparative de plusieurs isolats du virus de la mosaïque du concombre (CMV). Relations sérologiques au niveau du virus et de l'antigène soluble. *Ann. Phytopathol.*, **2**, 639-661.
- Devergne J. C., Cardin L.**, 1979. Phénomènes d'interférence entre souches du virus de la mosaïque du concombre (CMV). I. Répartition des antigènes viraux dans le *Nicotiana tabacum* var. *xanthi* nc. inoculé simultanément ou successivement par deux souches sérologiquement différentes. *Ann. Phytopathol.*, **11**, 409-419.
- Devergne J. C., Cardin L., Quiot J. B.**, 1978. Détection et identification sérologiques des infections naturelles par le virus de la mosaïque du concombre. *Ann. Phytopathol.*, **10**, 233-246.
- Devergne J. C., Cardin L., Burchardt J., Van Regenmortel M. H. V.**, 1981. Comparison of direct and indirect ELISA for detecting antigenically related cucumovirus. *J. Virol. Methods*, **3**, 193-200.
- Lecoq H., Cohen S., Pitrat M., Labonne G.**, 1979. Resistance to Cucumber Mosaic virus transmission by aphids in *Cucumis melo*. *Phytopathology*, **69**, 1223-1225.
- Leroux J. P., Quiot J. B., Lecoq H., Pitrat M.**, 1979. Mise en évidence et répartition dans le sud-est de la France d'un pathotype particulier du virus de la mosaïque du concombre. *Ann. Phytopathol.*, **11**, 431-438.
- Marchoux G., Marrou J., Migliori A.**, 1967. Variation de la concentration en virus de la mosaïque du concombre au cours de l'infection chez différentes plantes. Cas du Piment. *Rap. Activité, Sin. Pathol. vég., Montfavet*, 95-114.
- Marchoux G.**, 1975. *Propriétés biologiques et génétiques des ARN du virus de la mosaïque du concombre*. Thèse, Univ. Aix-Marseille, n° A0 11489.
- Marchoux J., Pochard E., Gebre Selassie K., Daubeze A. M.**, 1982. Progrès dans la lutte contre le virus de la mosaïque du concombre (VMC) chez le piment. *23^e Coll. Soc. Fr. Phytopathol.*, Versailles, octobre 1982. Résumé in *Agronomie*, **3** (5), 496.
- Marrou J., Migliori A.**, 1968. Variation périodique du pouvoir pathogène du virus de la mosaïque du concombre dans les feuilles de tabac infectées par ce virus. *C. R. Acad. Sc., Ser. D*, **267**, 625-628.
- Marrou J., Migliori A., Duteil M.**, 1968. Dosage biologique du virus de la mosaïque du concombre sur *Vigna sinensis*. I. Influence de différents facteurs sur la sensibilité de la plante au virus. *Ann. Epiphyties*, **19**, H. S., 69-81.
- Messiaen C. M., Maison P., Migliori A.**, 1963. Le virus 1 du concombre dans le sud-est de la France. *Phytopathol. Méditerran.*, **2**, 251-260.
- Pochard E.**, 1977. Méthodes pour l'étude de la résistance partielle du virus de la mosaïque du concombre chez le Piment. *C. R. 3^e Cong. Eucarpia*, 5-8 juillet 1977, Montfavet.
- Quiot J. B., Devergne J. C., Cardin L., Verbrugge M., Marchoux G., Labonne G.**, 1979. Ecologie et épidémiologie du virus de la mosaïque du concombre dans le sud-est de la France. VII. Répartition de deux types de populations virales dans les cultures sensibles. *Ann. Phytopathol.*, **11**, 359-373.
- Risser G., Pitrat M., Rode J. C.**, 1977. Etude de la résistance du melon (*Cucumis melo* L.) au virus de la mosaïque du concombre. *Ann. Amélior. Plantes*, **27**, 509-522.
- Scott H.**, 1968. Serological behavior of cucumber mosaic virus (strain Y) and the virus protein. *Virology*, **34**, 79-90.