

Production d'un anticorps polyclonal pour la détection du virus de la jaunisse nanisante de l'orge ou Barley yellow dwarf virus (BYDV) en Tunisie

A. NAJAR^{1*}, S. KUMARI², K. MAKKOUK³

¹Laboratoire de Protection des Plantes, Institut National de la Recherche Agronomique de Tunisie.
Rue Hedi Karray, 2049 Ariana

²Seed Health Unit, International Center for Agricultural Research in the Dry Areas (ICARDA),
P.O.Box 114/5055, Beirut, Lebanon.

³National Council for Scientific Research, Beirut, Lebanon

*Corresponding author: asmanajara@yahoo.fr

Abstract - Barley yellow dwarf virus (BYDV) is the most important disease affecting cereals. In some regions of Tunisia, the contamination with BYDV can exceed 40% in barley and oats. Serological techniques are mass-screening diagnostic tools, rapid and highly sensitive developed to confirm viral infection using the adequate antibodies. These tests are of great importance since they may be used for large-scale surveys, epidemiological studies and for screening assays leading to the selection of resistant genotypes. However, the antibodies availability and their costs remain a challenge to achieve the planned analyzes. Within this context, this study aim to produce an anti-BYDV polyclonal antibody, of which quality and specificity were verified. In fact, the viral purification provides a ratio (UV 260/280) equal to 1.49, besides an amount of virus in barley leaves about 0.6 mg / kg of fresh material. Such concentration is highly estimated compared to reference values. The antiserum, produced from five weekly intramuscular injections in a New Zealand rabbit and analyzed after a series of dilutions, shows a positive reaction by TBIA and a high optical density by ELISA-DASI at high dilutions up to 1/1024000 and 1/16000, respectively. Moreover, a dilution up to 40 times of the antigen does not produce a decrease in the sensitivity of the antibodies used by ELISA -DASI. However, with Dot Blot the colorimetric reaction remains visible in comparison to the negative control, where no staining was detected and this up to 1/160 a dilution of the antigen. This anti-BYDV-PAV antibody, whose quality and specificity were verified, is currently used with success in comparison to the one acquired with foreign antibodies, previously used in our tests.

Keywords: BYDV, Polyclonal antibody, Purification, Titration, TBIA, ELISA

Résumé - Le virus de la jaunisse nanisante de l'orge ou *Barley yellow dwarf virus* (BYDV) est connu comme étant le virus le plus important sur céréales. En Tunisie, les contaminations peuvent dépasser les 40% sur orge et avoine dans certaines régions. Les techniques sérologiques sont des techniques de diagnostic de masses, rapides et de grande sensibilité qui ont été développées pour l'identification des infections virales lorsqu'on dispose d'anticorps adéquatement préparés. Elles sont d'une grande importance lors de prospections de grande envergure, dans les études épidémiologiques et également dans les essais de criblage pour la sélection de génotypes résistants. Or, la disponibilité des anticorps et leur coût peuvent constituer un obstacle à la réalisation des analyses envisagées. Dans ce contexte, l'objectif de notre étude vise la production d'un anticorps polyclonal anti-BYDV dont la qualité et la spécificité ont été vérifiées. En effet, La purification virale réalisée a donné d'une part un ratio (UV 260/280) égal à 1,49 et d'autre part une quantité de virus présent dans les feuilles d'orge aux environs de 0,6 mg/kg de matière fraîche. Une telle concentration est jugée satisfaisante par rapport à des valeurs de référence. L'antisérum produit suite à cinq injections intramusculaires espacées d'une semaine à un lapin new zélandais et analysé après une série de dilutions, montre une réaction positive par TBIA ainsi qu'une densité optique élevées par ELISA-DASI même à des dilutions élevées pouvant aller respectivement jusqu'à 1/1024000 et 1/16000. Par ailleurs, une dilution jusqu'à 40 fois de l'antigène n'engendre pas une diminution de la sensibilité des anticorps utilisés suite au test ELISA -DASI alors que par Dot Blot, la réaction colorimétrique, demeure visible par rapport à celle du témoin négatif n'ayant montré aucune coloration, et ce jusqu'à une dilution au 1/160 de l'antigène. Cet anticorps anti-BYDV-PAV dont la qualité et la spécificité ont été vérifiées est actuellement utilisé avec un succès comparable à celui obtenu avec des anticorps étrangers ayant servi dans nos essais antérieurs.

Mots clés: BYDV, Anticorps polyclonal, Purification, Titration, TBIA, ELISA

1. Introduction

En Tunisie, le secteur céréalière revêt une importance primordiale puisque ses produits contribuent de façon déterminante à l'équilibre alimentaire du pays et sont considérés comme produits stratégiques dans la politique économique nationale. Néanmoins, les niveaux de production restent toujours tributaires des aléas climatiques et de la prolifération des maladies qui sévissent dans la plupart des régions. Parmi les stress biotiques, les maladies virales, présentent une contrainte majeure limitant l'expression des potentialités génétiques de la plupart des espèces et variétés cultivées. Plusieurs virus peuvent attaquer les céréales, mais le plus important est le virus de la jaunisse nanisante de l'orge ou *Barley Yellow Dwarf Virus* (BYDV). Depuis sa découverte par Oswald et Houston (1951), ce virus a fait l'objet de plusieurs travaux. Il est reconnu depuis quelques temps comme ayant une large distribution mondiale et possède toutes les caractéristiques des virus des végétaux les plus graves (Plumb, 1983 ; Rochow *et al.*, 1986). Il serait responsable d'une perte annuelle de 1 à 3% de la production céréalière à l'échelle internationale. Cette perte peut atteindre 20 à 30 % en cas d'épidémies dans certaines régions (CIMMYT, 1984). Au Canada en l'occurrence, une épidémie de ce virus survient une fois tous les quatre ans (Haber, 1990). En grande Bretagne, c'est la plus importante des maladies céréalières (Baker, 1990). En Italie, l'infection du riz par le BYDV a été signalée depuis longtemps (Gorbetta, 1967) jusqu'à ce que les variétés de riz résistantes à ce virus furent introduites. Dans ce même pays, l'orge, le blé et l'avoine ont souffert pour la première fois d'une sévère infection par le BYDV en 1977 et 1978. D'autres épidémies ont été rapportées un peu partout dans le monde, notamment en Chine en 1978, au Maroc en 1980, en Syrie en 1982, en Espagne en 1983 et en Turquie en 1983 (Conti *et al.*, 1990). Les prospections réalisées en Tunisie au cours de cette dernière décennie a montré que le virus de la jaunisse nanisante de l'orge ou BYDV transmis par pucerons est considéré comme étant le virus le plus important avec des taux de contaminations qui peuvent atteindre sur orge plus de 40% dans certaines régions (Najar *et al.*, 2009; Najar *et al.*; 2014 ; Bouallegue *et al.*, 2014) . Les techniques sérologiques sont des techniques de diagnostic de masses, rapides et de grande sensibilité qui ont été développées pour l'identification des infections virales lorsqu'on dispose d'anticorps adéquatement préparés. Elles sont d'une grande importance pour le contrôle des plants de base, en sélection sanitaire, en certification, dans les essais de résistance et pour le contrôle phytosanitaire aux frontières étant donné leur rapidité, leur facilité et le grand nombre d'échantillons qu'elles peuvent traiter. Or, la disponibilité des anticorps et leur coût peuvent constituer un obstacle à la réalisation des analyses envisagées. C'est pour cela que l'objectif de ce présent travail est la production d'un anticorps polyclonal vis à vis du BYDV souche tunisienne qui permettrait à mener d'une part des enquêtes de grande envergure pour le suivi régulier de l'incidence virale et l'importance de ce virus sur toutes les cultures céréalières (blé, orge, avoine , triticale.....) et d'autre part à la sélection de génotypes résistants au virus au sein de divers programmes d'amélioration.

2. Matériel et méthodes

La production d'un anticorps polyclonal se déroule en deux grandes étapes, dont la première consiste à purifier des particules virales et la deuxième étape à immuniser un lapin par l'antigène viral purifié.

2.1. Souche virale et matériel végétal utilisés

La souche *Barley yellow dwarf virus*- PAV (BYDV-PAV) utilisée pour cette étude, est une souche provenant d'une parcelle d'orge contaminée dans la région du Cap Bon, qui a été identifiée par test sérologique (ELISA-DAS) d'après la méthode de Clark et Adams (1977) moyennant l'utilisation d'un anticorps polyclonal spécifique provenant de la compagnie BIOREBA (Switzerland). L'ELISA-DAS est basée sur la capture de l'antigène par l'anticorps spécifique et sa révélation grâce à une réaction colorimétrique qui se développe en présence d'une enzyme, la Phosphatase alcaline (AP) conjuguée à l'anticorps. La lecture des densités optiques des produits colorés obtenus est effectuée moyennant un spectrophotomètre (Titertek, Multiscan MCA). Les échantillons dont la densité optique est deux fois à trois fois supérieure à celle de l'échantillon négatif sont considérés positifs.

La souche BYDV-PAV a été maintenue sous serre vitrée sur orge variété Manel communément cultivée et connue pour sa sensibilité à ce virus (Najar, 2009).

La purification du virus est réalisée à partir de 1000 g de matériel végétal frais infectés.

2.2. Méthodologie

2.2.1. Transmission du virus par pucerons

Afin d'avoir une quantité de 1000g nécessaire à la purification du virus, une multiplication de la souche à partir du puceron vecteur le plus efficace *Rhopalosiphum padii* est réalisée.

Les pucerons sont mis pendant 48 heures sur des feuilles d'orge Manel contaminées par le BYDV-PAV pour l'acquisition du virus et ce après avoir subi 1 jour de jeun. Ils sont ensuite répartis sur une trentaine de pots d'orge de la variété Manel avec une moyenne de 5 pucerons par plantule. Après 48 heures de transmission, les pucerons sont éliminés par traitement insecticide.

Une quinzaine de plantules par pot sont testées après 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18, 20 et 22 jours d'inoculation. Au bout de 18 jours, la plus forte concentration du virus dans les feuilles est prouvée par test ELISA DAS (Clark et Adams, 1977).

Le matériel végétal infecté est donc collecté après 18 jours d'incubation et ramené au laboratoire pour la purification des protéines virales.

2.2.2. Purification du virus

Pour assurer l'immunisation du lapin, une série de purifications a été réalisée. La méthode adoptée pour purifier les particules virales est celle décrite par Horn *et al.* (1993). 1000 g de feuilles d'orge contaminées sont broyées en présence d'azote liquide par purification réalisée. L'échantillon broyé est transféré dans un erlenmeyer contenant 3 volumes (1g/3ml) de tampon d'extraction. Le tampon est composé de : KPO₄ 0,1M pH 6, 2% celluclast, 0,1% 2-mercapthoetanol, 0,02% acide de sodium (NaN₃). Le mélange est incubé à 4°C pendant une nuit.

Le Triton X 100 est ajouté à raison de 1% après filtration du mélange sur quatre couches d'étamines de gaze. Le tout est laissé en homogénéisation pendant 3 heures à température ambiante. 1/6 volume chloroforme: buthanol (1:1) est additionné et le tout est homogénéisé encore une fois pendant 10mn à température ambiante. L'extrait est clarifié par centrifugation pendant 30' à 7000 rpm. Le surnageant est récupéré.

Une première précipitation au polyéthylène glycol (PEG 8000) à 8%, en présence de NaCl 1%, est effectuée sur le surnageant pendant 1heure à 4°C. Après centrifugation à 6000 rpm pendant 30mn, le culot est remis en suspension dans le tampon KPO₄ 0,1M pH 6 additionné de 1% Triton X100. La re-suspension se fait en agitation pendant une nuit à 4°C. Ensuite une centrifugation à 7000 rpm pendant 10mn, suivie d'une ultracentrifugation à 30000 rpm pendant 3heures. Le culot est re-suspendu dans du KPO₄ 0,1M pH 7 pendant une nuit à 4°C. Après centrifugation à 5000 rpm pendant 5mn, la préparation virale ainsi obtenue est partiellement purifiée.

La concentration du virus est réalisée par ultracentrifugation sur coussinet de saccharose à 20% dans le tampon 0,1M KPO₄ pH 7 à 32000 rpm pendant 3 heures. Le culot obtenu est re-suspendu dans un minimum de tampon KPO₄ 0,1M pendant une nuit à 4°C. Les particules virales pré-purifiées subissent une autre centrifugation sur gradient de saccharose.

Le gradient de densité de saccharose utilisé est un gradient discontinu, constitué de couches successives de 2,5ml chacune de solution de 40, 30, 20, 10 % de saccharose dans le tampon KPO₄ 0,1 M et maintenu pendant une nuit à 4°C.

La solution virale semi purifiée obtenue à l'étape ultracentrifugation sur coussinet est déposée puis centrifugée à 38000 rpm pendant 1h30 à 4°C. La bande de particules virales est collectée par fractionnement du gradient de saccharose à l'aide d'un appareil de type ISCO relié à un spectrophotomètre. La fraction contenant le maximum d'absorbance à 260 nm est récupérée puis conservée à -20°C jusqu'à son utilisation dans la production d'un anticorps polyclonal.

2.2.3. Production d'anticorps

A partir du BYDV purifié, nous réalisons 5 injections intramusculaires espacées d'une semaine à un lapin new zélandais. Chacune d'elle contient entre 0,2 à 0.3mg de virus.

La première injection se fait en présence d'un volume égal d'adjuvant complet de Freud qui est une émulsion d'eau et d'huile minérale additionnées d'un agent émulsifiant (Tween) et d'extrait de mycobactéries tuées (*Mycobacterium tuberculosis*). Les injections qui suivent sont réalisées en ajoutant un adjuvant incomplet de Freud qui est une émulsion d'eau et d'huile minérale (Jennings, 1995). Une injection de rappel est faite au lapin après 6 semaines de la dernière injection.

Une semaine après la 5^{ème} injection, on effectue sept saignées au niveau de l'oreille du lapin, espacées d'une semaine. Le volume de chaque saignée est au environ de 35 à 40 ml. L'antisérum est récupéré après décantation des globules rouges, puis conservé à -20°C.

2.3. Evaluation de la qualité de l'antisérum.

2.3.1. Titration de l'antisérum

L'évaluation de la qualité de l'antisérum produit est réalisée moyennant 2 techniques sérologiques: ELISA-DASI et le test d'immunoempreinte ou Tissu Blot Immunoassay (TBIA) (Makkouk et Kumari, 1996). La première technique suit le même protocole que l'ELISA-DAS avec la différence que l'antigène viral dans ce cas est détecté par une immunoglobuline marquée « anti-anticorps » obtenu à partir d'un animal autre que celui qui a servi à l'obtention des anticorps spécifiques. Dans ce cas c'est un antisérum anti-lapin produit à partir de la chèvre qui est utilisé à une dilution au 1/2000 (Sigma). La deuxième technique (TBIA) repose sur le même principe de réaction immunoenzymatique que le test ELISA sauf que dans ce cas le support qui est constitué d'une plaque en polystyrène dans le cas de l'ELISA, est remplacé par une membrane en nitrocellulose. Le virus est fixé directement sur la membrane. L'utilisation du substrat insoluble qui est un mélange de NBT (Nitro Bleu de Tétratosodium) et BCIP (Bromo Chloro Indosyl Phosphate) permet de visualiser, la réaction colorimétrique sur la membrane. Cette réaction est visualisée avec une loupe binoculaire de type Leica par l'observation d'un précipité violacé, au niveau de l'empreinte de l'échantillon.

Pour la titration de l'anticorps produit, des dilutions successives sont réalisées allant de 1/500 jusqu'à 1/4096000 et ceci à partir des sept saignées collectées

Pour minimiser les réactions non spécifiques, un extrait de plantes d'orge saines est ajouté aux différentes dilutions de l'antisérum, permettant de précipiter les anticorps dirigés contre les protéines de la plante.

2.3.2. Dilution de l'antigène

La qualité de l'antisérum est également évaluée par des dilutions successives de l'antigène (1/20 jusqu'à 1/320) pour tester si la sensibilité de l'antisérum peut diminuer quand la concentration du virus dans la plante est faible. Cette évaluation est réalisée par deux tests sérologiques l'ELISA-DASI et le Dot-Blot. Pour ce dernier, il s'agit d'un test qualitatif permettant la vérification de la présence ou non du virus dans l'extrait de l'orge et présente l'avantage d'être rapide et ne nécessite pas beaucoup d'extrait (Pollini *et al.*, 1993). La technique consiste à déposer l'extrait sur une membrane de nitrocellulose. Les dépôts ont une forme ronde, d'où le nom anglais Dot-Blot. Les particules virales sont détectées d'une manière indirecte comme dans le cas de la DASI c'est-à-dire par une immunoglobuline anti-lapin couplée à la phosphatase alcaline. Quelques gouttes de l'extrait sont déposées à l'aide d'une micropipette sur la membrane de nitrocellulose. Cette dernière est séchée à l'air libre puis saturée dans une solution de BSA (Bovin Serum Albumin) à 1% pendant une heure. Un lavage avec un tampon PBST est effectué avant d'incuber la membrane avec les anticorps produits, puis avec un anticorps chèvre anti-lapin couplés à la phosphatase alcaline (Sanofi, France) dilués au 1/2000 dans le PBST, pendant 2 heures à 37°C. Après une série de trois lavages espacés de 5mn, la membrane est incubée dans une solution de révélation contenant du NBT/BCIP. L'apparition de la coloration violacée indique la présence du virus.

3. Résultats

La production d'un anticorps dirigée contre la souche BYDV-PAV ne peut être jugée satisfaisante que si un certain nombre de conditions sont pleinement remplies.

Nous allons voir ci-après, le degré de fiabilité de cet anticorps en évoquant les résultats des tests de vérification effectués à ce propos.

3.1. Evolution de la concentration du virus

Une fois inoculé à la variété d'orge sensible (Manel), le virus a tendance à se multiplier progressivement pour atteindre un niveau de contamination maximale qui correspond à une augmentation de la concentration des particules virales dans le tissu végétal. Dans le présent cas, cette hypothèse est amplement vérifiée par le test sérologique ELISA (Kit Bioreba, Switzerland) qui montre que la souche BYDV-PAV atteint un maximum de concentration dans la partie aérienne des plantes

justifiée par une densité optique supérieure à 2, 18 jours après inoculation sur la base des densités optiques obtenues (figure 1). Sur la base de ces résultats, 1000 gr environ de matériel végétal infecté sont prélevés et ramenés au laboratoire pour une purification de l'antigène.

3.2. Purification des particules virales

Les protéines virales purifiées après ultracentrifugation montrent une seule bande dans la colonne du gradient de saccharose. Cette bande de 3,5ml de volume est récupérée après fractionnement du gradient de saccharose à l'aide d'un appareil de type ISCO et la fraction contenant le maximum d'absorbance à une longueur d'onde de 260 nm est collectée (figure 2).

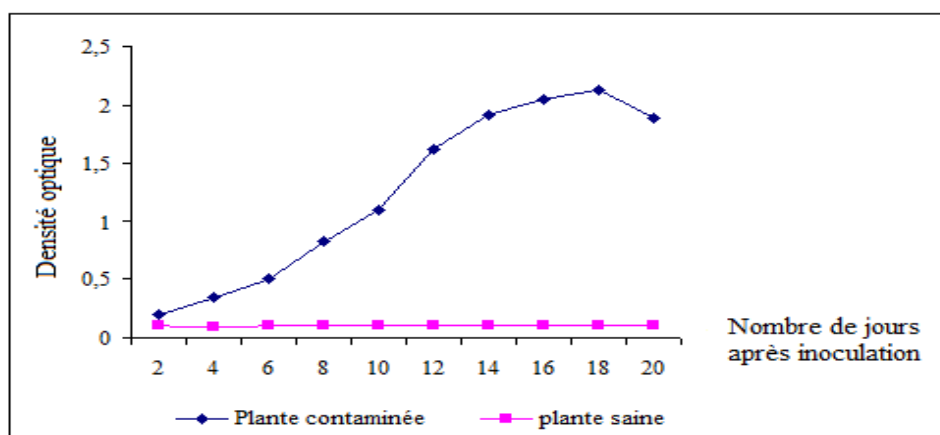


Figure 1. Evolution chronologique de la concentration virale de la souche BYDV-PAV estimée par la densité optique dans les extraits de feuilles d'orge Manel.

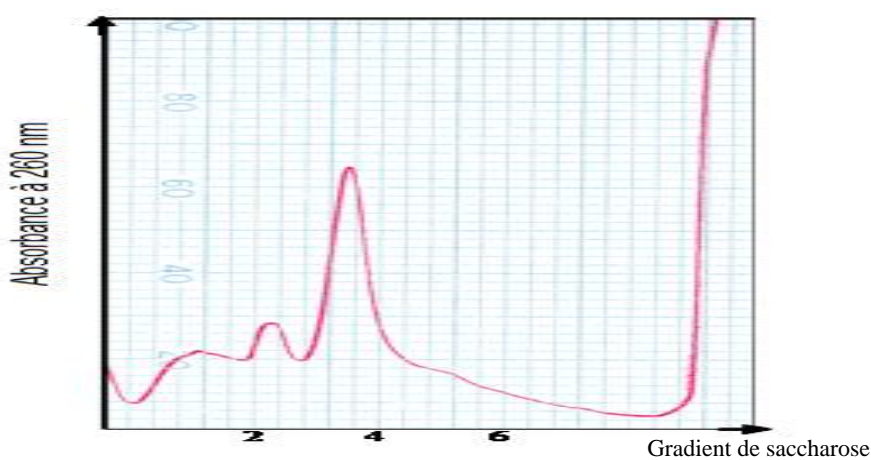


Figure 2. Absorbance UV (260 nm) des fractions virales purifiées du BYDV-PAV après ultracentrifugation à 380000 rpm pendant 1h30 sur gradient de saccharose (10-50%).

La mesure des densités optique (D.O) de la fraction virale purifiée réalisée par spectrophotométrie aux longueurs d'ondes UV 260 et 280 nm permet de calculer le ratio 260/280 qui est de 1,49. Ce ratio donne une idée sur la réussite de la purification du virus. La D.O à 260nm sert à la détermination de la quantité de virus obtenue à partir du matériel végétal infecté par la souche BYDV-PAV.

Cette quantité est déduite de la formule suivante :

$$\text{Quantité du virus (QV)} = \text{DO (260)} \times \text{Vol} / \text{Coeff. Extin (C.E)}$$

Où

DO= densité optique à 260 nm = 0,823

Vol=volume de la fraction virale purifiée = 3,5ml.

C.E= Coefficient d'extinction fixé pour chaque virus. Ce coefficient est égal à 5 pour le BYDV

La quantité de virus purifiée serait donc : **QV= 0,58mg/Kg de matière fraîche**

3.3. Evaluation de la qualité de l'antisérum

La réussite de la production d'anticorps est principalement estimée par évaluation du titre d'anticorps sérique permettant de mettre en évidence la qualité de l'antisérum produit. La titration est réalisée suivant deux techniques sérologiques : la technique TBIA et la technique ELISA DASI moyennant l'utilisation d'une immunoglobuline universelle chèvre -anti-lapin marquée à la phosphatase alcaline. La fiabilité de l'antisérum produit est vérifiée aussi bien avec le test TBIA qu'avec le test ELISA après une série de dilutions qui lui sont appliquées.

3.3.1. Evaluation par la technique TBIA

Les résultats consignés au tableau 1 montrent que l'antigène du virus BYDV- PAV est détecté par l'antisérum produit et dont la dilution peut aller jusqu'à 1/1024000 pour les 1^{er}, 3^{ème}, 4^{ème}, 5^{ème} et 6^{ème} saignées. Pour la 2^{ème} saignée, la réaction anticorps antigène est révélée à une dilution supérieure à savoir 1/2048000.

Tableau 1. Titration par TBIA de l'antisérum produit après immunisation du lapin par les protéines virales du BYDV-PAV-T, pour sept saignées successives

Dilution de L'anticorps	Numéro de la saignée							
	Témoin sain	1	2	3	4	5	6	7
1/500	-	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++
1/1000	-	+++	+++	+++	+++	++	+++	+++
1/2000	-	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++
1/4000	-	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++
1/8000	-	+++	+++	+++	+++	++	++	+++
1/16000	-	+++	+++	+++	+++	++	++	+++
1/32000	-	+++	+++	+++	+++	++	+	++
1/64000	-	+++	+++	+++	++	++	+	+
1/128000	-	++	+++	++	++	++	+	+
1/256000	-	++	++	++	++	++	+	+
1/512000	-	+	+	+	+	+	+	-
1/1024000	-	+	+	+	+	+	+	-
1/2048000	-	-	+	-	-	-	-	-
1/4096000	-	-	-	-	-	-	-	-

(+) : virus détecté;
 (-) : virus non détecté

3.3.2. Evaluation par la technique ELISA DASI

Les résultats de ce test sont récapitulés dans le tableau 2. Les échantillons sont considérés positifs lorsque la densité optique est supérieure ou égale à deux fois celle du témoin négatif. Dès lors, nous déduisons que les réactions sont positives pour toutes les saignées jusqu'à une dilution de 1/16000 (tableau 2). Néanmoins, nous pouvons aller à une dilution supérieure (1/32000) dans les 1^{ère}, 2^{ème}, 3^{ème} et 4^{ème} saignées.

Le titre de l'antisérum récupéré à la 2^{ème} saignée est globalement le plus élevé, quelle que soit la dilution, d'autant plus que la DO enregistrée dépasse deux fois celle du témoin négatif à 1/64000.

Tableau 2. Titration par ELISA DASI (DO 405 nm) de l'antisérum produit après immunisation du lapin par les protéines virales du BYDV-PAV-T, pour sept saignées successives.

Dilution de L'anticorps	Densité optique à 405 nm							
	Numéro de la saignée							
	Témoin sain	1	2	3	4	5	6	7
1/500	0,16	2,36	2,62	1,98	2,02	1,60	1,55	2,32
1/1000	0,15	1,54	1,78	1,55	1,63	1,15	1,34	1,62
1/2000	0,16	1,28	1,44	1,25	1,30	0,94	1,01	1,54
1/4000	0,17	1,35	1,35	1,10	1,21	0,80	0,76	1,45
1/8000	0,18	1,02	1,12	0,90	1,08	0,46	0,50	0,84
1/16000	1,16	0,53	0,78	0,45	0,75	0,41	0,53	0,40
1/32000	0,17	0,42	0,54	0,45	0,35	0,23	0,18	0,32
1/64000	0,14	0,21	0,41	0,18	0,17	0,14	0,08	0,18
1/128000	0,15	0,21	0,23	0,09	0,04	0,06	0,00	0,00
1/256000	0,16	0,10	0,20	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
1/512000	0,17	0,04	0,11	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
1/1024000	0,17	0,00	0,01	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
1/2048000	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
1/4096000	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00

3.4. Evaluation de l'antisérum après dilution de l'antigène

La dilution de l'antigène est réalisée dans le but de tester la sensibilité de l'antisérum produit lorsque la concentration du virus est relativement faible.

L'antisérum utilisé est celui de la 2^{ème} saignée dont le titre s'est révélé globalement supérieur aux autres. Pour réaliser ce test, les deux techniques sérologiques ELISA-DAS et Dot-Blot ont été appliquées.

3.4.1. Evaluation par ELISA-DASI

Les résultats du test ELISA-DASI sont consignés au tableau 3.

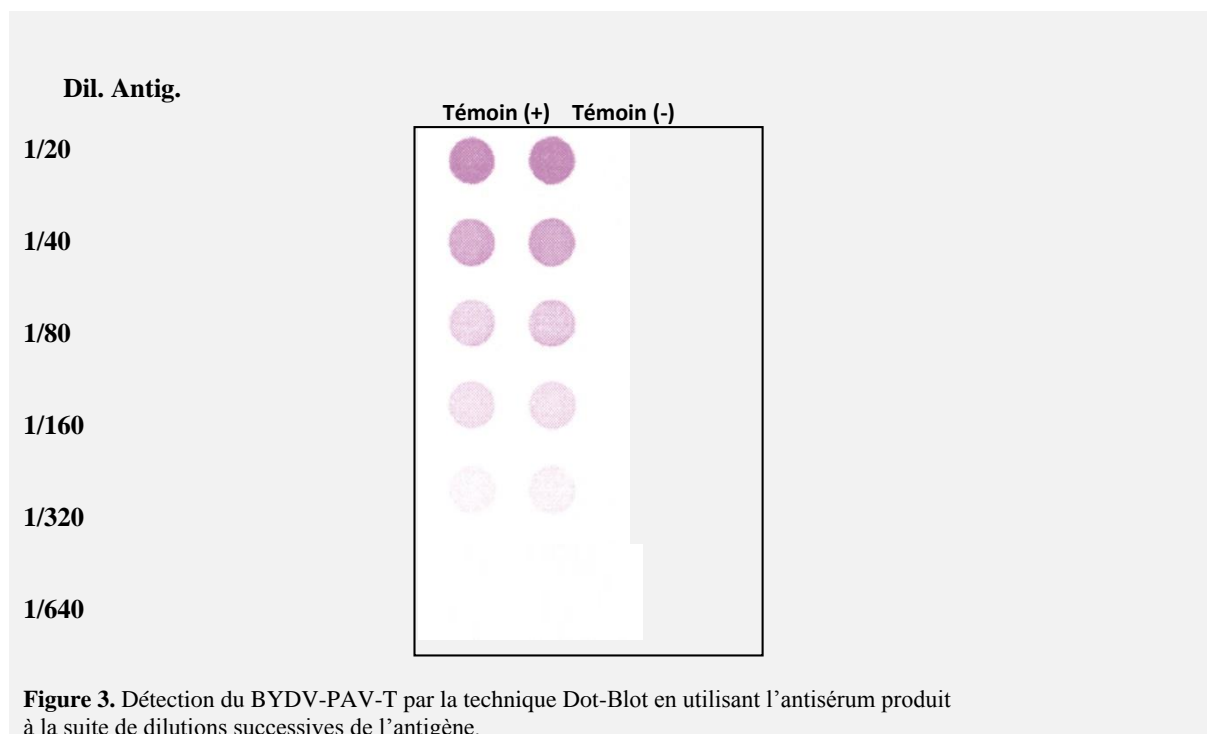
Tableau 3. Détection du BYDV-PAV-T par la technique sérologique ELISA-DASI utilisant l'antisérum produit par suite de dilutions successives de l'antigène.

Antigène	Densité optique (DO) à 405 nm					Témoin sain
	1/20	1/40	1/80	1/160	1/320	
Antisérum						
1/1000	1,56	0,91	0,45	0,31	0,12	0,17
1/2000	1,10	0,73	0,34	0,25	0,08	0,16

Ces résultats permettent de relever qu'une dilution jusqu'à 40 fois de l'antigène n'engendre pas une diminution de la sensibilité des anticorps utilisés. En effet, les densités optiques enregistrées restent élevées avec respectivement une DO de 0,91 et 0,73 lorsque l'antisérum est dilué au 1/1000 et 1/2000. A la dilution 1/80 de l'antigène, la détection du virus est encore possible particulièrement quand l'antisérum est à une concentration de 1/1000.

3.4.2. Evaluation par Dot-Blot

La réaction colorimétrique révélée par le substrat NBT/BCIP sur membrane de nitrocellulose telle qu'illustrée par la figure 3, demeure visible par rapport à celle du témoin négatif n'ayant montré aucune coloration, et ce jusqu'à une dilution au 1/160 de l'antigène.



4. Discussion

L'objectif de ce travail étant de produire un antisérum de bonne qualité destiné à l'utilisation dans les tests sérologiques de routine. Il est impératif cependant, que les étapes menant à cet objectif soient entièrement maîtrisées.

Partant d'une souche préalablement caractérisée BYDV-PAV, sa multiplication sur hôte sensible, sa purification, son injection au lapin et la récupération de l'antisérum correspondant furent rigoureusement suivies.

Après transmission par *Rhopalosiphum padii* de la souche PAV-T à une orge sensible Manel, les tests ELISA réalisés pour le suivi de l'évolution de la concentration du virus, ont montré qu'elle atteint son maximum 18 jours après l'inoculation. La densité optique correspondante qui est de l'ordre de 2,13 est, selon la littérature suffisamment élevée et permet la réalisation de l'étape de purification du virus (Lister et Hadidi, 1971, Makkouk *et al*, 1993).

La purification réalisée à partir de la seule bande générée par le gradient de sucrose (10-50%), a donné d'une part un ratio (UV 260/280) égal à 1,49 et d'autre part une quantité de virus présent dans les feuilles d'orge aux environs de 0,6 mg/kg de matière fraîche. Une telle concentration jugée satisfaisante par rapport à des valeurs de référence (Makkouk et Kumari, 1993) est donc la preuve d'une bonne purification.

L'antigène BYDV-PAV ainsi purifié, est ensuite injecté à un lapin New Zélandais pour la production d'un anticorps polyclonal. L'antisérum prélevé et analysé après une série de dilutions, montre une réaction positive par TBIA ainsi qu'une densité optique élevées par ELISA-DASI même à des dilutions élevées.

Le témoin négatif ne donnant que de très faibles densités optiques de l'ordre de 0,16 prouve en outre l'absence de réactions non spécifiques.

Tous ces résultats s'accordent sur le fait que l'antisérum produit est de qualité jugée satisfaisante aussi bien en termes de réactivité qu'en termes de spécificité qui sont étroitement liées à la dose d'immunogène injectée (Torrance *et al.*, 1986). Une trop forte ou trop faible quantité d'immunogène pourrait induire un phénomène de tolérance chez l'animal injecté. Il semble que la quantité de virus purifié que nous avons injecté au lapin (0,5-1mg/ injection) a donné une bonne réponse immunitaire suite à plusieurs rappels de l'immunogène. D'ailleurs Kumari *et al.* (2006) rapportent qu'une même quantité de virus purifié de CpCDV (*Chickpea Chlorotic Dwarf Virus*) administrée au lapin, a permis la production d'un antisérum de haute qualité ayant un titre de 1/320000.

Sur la base d'une évaluation visuelle de l'infection, le Dot-Blot est un test très sensible pour le diagnostic du BYDV, puisqu'il permet la visualisation d'une réaction colorimétrique claire sur la membrane jusqu'à une dilution de 1/160. Il peut donc remplacer aisément le test ELISA quand il s'agit de tester des échantillons lyophilisés et/ou conservés à -20°C. Ceci a été rapporté par d'autres auteurs (Hsu *et al.*, 1990; Makkouk *et al.*, 1993; Kumari *et al.*, 2006).

L'antisérum peut entre autres, servir à la détection du virus même à faible concentration puisque les dilutions de l'antigène au 1/20 et 1/40 n'ont pas affecté sa sensibilité.

Nous serons ainsi en mesure de l'utiliser dans des études épidémiologiques et notamment dans les essais de sélection de lignées résistantes au BYDV où un grand nombre d'échantillons doit être testé.

5. Conclusion

Les études relatives à l'identification de l'incidence virale et l'épidémiologie des virus les plus importants tel que le BYDV considéré comme étant le virus le plus dévastateur sur céréales, ainsi que la sélection de génotypes résistants comme moyen de lutte requièrent l'utilisation des techniques sérologiques qui sont des techniques de diagnostic de masses, rapides et de grande sensibilité. Les protocoles sérologiques tels que le TBIA ou l'ELISA se font impérativement avec des anticorps dirigés à l'encontre des antigènes en question. Or, la disponibilité de ces anticorps et leur coût peuvent constituer un obstacle à la réalisation des analyses envisagées. Étant donnée que ces analyses requièrent un grand nombre d'échantillons, surtout dans ce cas particulier d'étude, nous avons produit un anticorps polyclonal anti-BYDV-PAV dont la qualité et la spécificité ont été vérifiées. Depuis, nous utilisons ce produit avec un succès comparable à celui obtenu avec des anticorps étrangers ayant servi dans nos essais antérieurs.

6. Références

- Baker I (1990)** Barley yellow dwarf in Britain. In Proceeding of an International Symposium on World perspectives on Barley yellow dwarf. Burnett P. A., Eds CIMMYT, Mexico: 39-41.
- Bouallegue M, Mezghani-Khemakhem M, Bouktila D, Makni H, Makni M (2014)** Molecular characterization of barley yellow dwarf virus in Tunisia. *Acta.Virologica*. 58: 214-222.
- CIMMYT (1984)** Barley yellow dwarf. A proceeding of the Workshop. Eds CIMMYT, Mexico.511p.
- Clark MF, Adams AN (1977)** Characteristics of the microplate method of enzyme-linked immunosorbent assay for the detection of plant viruses. *J. Gen. Virol.* 34: 475-483.
- Conti M, D'Arcy CJ, Jedlinski H, Burnett PA (1990)** The "yellow plague" of cereals, barley yellow dwarf virus. In Proceeding of an International Symposium on World Perspectives on Barley yellow dwarf. Burnett P.A., Eds CIMMYT, Mexico:1-6.
- Gorbetta G (1967)** La "Nuova malattia" che colpisce il riso. *Il Risicoltura*. 2: 1-3.
- Haber S (1990)**. Situation review of Barley yellow dwarf in Canada. In Proceeding of an International Symposium on World perspectives on Barley yellow dwarf. Burnett P.A. (Eds). CIMMYT, Mexico. pp: 7-10.
- Hsu HT, Hibino H, Cabauatan PQ (1990)** Development of serological procedures for rapid sensitive and reliable detection of rice grassy stunt virus. *Plant Dis.* 74: 695-698
- Jennings VM (1995)** Review of adjuvants used in antibody production. *Animal. Res. J.* 37: 119-125.
- Kumari SG, Makkouk KM, ATTAR N (2006)** An improved antiserum for sensitive serologic detection of Chickpea chlorotic dwarf virus. *J. Phytopath.* 154: 129-133.
- Lister RM, Hadidi AF (1971)** Some properties of apple chlorotic leaf spot and their relation to purification problems. *Virol.* 45: 240-251.
- Makkouk KM, Kumari SG (1993)** Production of antisera for sensitive detection of two cereal viruses by different ELISA variants. *Rachis*. 12 (1/2): 24-27.
- Makkouk KM, Hsu HT, Kumari SG (1993)** Detection of three plant viruses by dot-blot and tissue-blot immunoassays using chemiluminescent and chromogenic substrates. *J. Phytopath.* 139: 97-102.
- Makkouk KM, Kumari SG (1996)** Detection of ten viruses by the tissu-blot. immunoassays (TBIA). *Arab. J. Plant. Prot.* 14:3-9.
- Najar A (2009)** le virus de la jaunisse nanisante de l'orge. Importance, Caractérisation moléculaire et intégration dans la sélection de lignées d'orge résistantes. Thèse de Doctorat en Sciences Agronomiques. INAT, Univ Tunis, 240p.
- Najar A, Hamdi I (2014)** *Barley yellow dwarf virus* (BYDV) inTunisia: Distribution on barley crops and molecular characterization. 11th Arab Congress of Plant Protection, 9-13 November 2014, Amman, Jordany.

- Oswald JW, Houston BR (1951)** A new virus disease of cereals transmissible by aphids. *Plant Dis. Rep.* 35: 471-475.
- Plumb RT (1983)** Barley yellow dwarf virus-aglobal phloem. In *Plant virus epidemiology* Plum R.L., Tresh J.M. (Eds). Blackwell, London, UK. 222p.
- Pollini CP, Giunchedi L, Creedi R (1993)** A chemiluminescent immunoassay for the diagnosis of grapevine closteroviruses on nitrocellulose membrane. *J. Virol. Meth.* 42: 107-116.
- Rochow WF, Muller I, Tufford LA, Smith DM (1986)** Identification of luteoviruses of small grains from 1981 through 1984 by two methods. *Plant dis.* 70: 461-464.
- Torrance L, Pead HT, Larkins AP, Butcher GW (1986)**. Characterization of monoclonal amino acid substitution in the turnip yellow mosaic virus movement protein. *Molec. Plant Microb. Int.* 8: 268-273.