PURIFICATION ET IDENTIFICATION DU VIRUS DE LA MOSAIQUE DU TABAC A MADAGASCAR

par

Marie Thérèse GENSE (1), M. WURTZ (2) et P. BAUDIN (3)

Les symptômes de la Mosaïque du tabac sont connus depuis de nombreuses années à Madagascar. Ils sont très caractéristiques : les feuilles de tabac présentent une juxtaposition de plages vert clair et vert sombre (Fig. 1). Bouriquet (1946) a observé ces symptômes sur les Plateaux et dans la région de Miandrivazo. Depuis, la maladie a été observée partout où il y a culture de tabac ; la contamination peut être généralisée après la première récolte. L'affection a été diagnostiquée sur simple vue des symptômes. Mais œux-ci, sur tabac, peuvent être dus à des virus différents : le virus de la Mosaïque du tabac ou V.M.T., diverses souches du virus sphérique de la Mosaïque du concombre ou V.M.C. (Lucas, 1965).

En saison des pluies, les cultures de tomate présentent également de nombreux symptômes de Mosaïque. Il peut s'agir du virus de la maladie bronzée de la tomate ou T.S.W.V. (BAUDIN, 1968) ou bien du V.M.T., bien connu dans le monde sur cette culture (Messiaen et Lafon, 1963). Il importait de préciser le diagnostic de ces maladies

I. - EXPERIENCES PRELIMINAIRES

Des feuilles de tomate présentant des symptômes de Mosaïque sont récoltées dans une culture maraîchère des environs de Tananarive. Après broyage des seuilles dans un tampon phosphate 0,01 M, traitement des extraits 10 mn à 60°C et centrifugation 15 mn à 5000 g, les extraits sont inoculés à des tabacs, variété « Misionero », par frottement des feuilles préalablement saupoudrées de carborundum. Les tabacs montrent des symptômes caractéristiques de Mosaïque au bout de trois semaines. Le traitement à la chaleur n'a donc pas détruit le pouvoir pathogène du virus qui, ainsi, ne peut être ni le T.S.W.V., ni le V.M.C., détruits à 60°C.

⁽¹⁾ Laboratoire de Botanique, Faculté des Sciences de Tananarive.

⁽²⁾ O.R.S.T.O.M., Tananarive.

⁽³⁾ Laboratoire de Phytotechnie, Ecole Nationale Supérieure Agronomique de l'Université de Madagascar.

Des extraits virosés, inoculés à des tabacs de variété « Samsun N.N. », par frottement des feuilles, provoquent l'apparition de nombreuses lésions locales, analogues à celles dues au V.M.T.

Ces expériences préliminaires permettent déjà d'avoir une forte présomption sur l'existence d'une souche de V.M.T. à Madagascar, en grande culture de tabac et de tomate. Les expériences suivantes en apportent la confirmation.

II. - PURIFICATION DU VIRUS

La méthode de purification utilisée a été décrite par LEBEURIER et HIRTH (1966). Elle vise à extraire le virus à partir de faibles quantités de feuilles (200 g) et à produire du virus hautement purifié. Cette technique fait appel à des centrifugations différentielles ; les détails en sont résumés dans le tableau 1.

III. - RESULTATS

Ils sont obtenus à partir de virus purifiés par la méthode décrite ci-dessus.

1. - Propriétés physico-chimiques.

a) Spectre d'absorption

Le spectre du virus purifié (Fig. 2) est celui d'une nucléoprotéine : le maximum d'absorption se situe à 263 nm. Le rapport des D.O. lues à 260 nm et à 280 nm est de 1,18, valeur indiquant que la suspension de virus contient presque uniquement des virions, sans capsides libres. La D.O. à 260 nm permet de connaître la concentration d'une suspension : pour une D.O. égale à l'unité, la teneur correspondante en V.M.T. est de 0,310 mg/ml (Lebeurier et Hirth, 1966). A partir de 200 g de feuilles, nous avons évalué, par cette méthode, la quantité de virus purifié à 100 mg.

b) Point isoélectrique

La méthode utilisée est celle de OSTER (1951), modifiée par WURTZ (1969). Le virus est en suspension dans de l'eau distillée (pH 5,25). A la fin de la purification, le culot étant repris dans le tampon phosphate-NaCl, il est nécessaire de sédimenter le virus afin de le remettre en suspension dans l'eau distillée. Avec une pipette Pasteur, on ajoute goutte à goutte HCl 0,005 N et après chaque adjonction, on mesure le pH et la D.O. à 460 nm. On trace ensuite la courbe des D.O. 460 en fonction du pH (Fig. 3). La turbidimétrie augmente brutalement à pH 3,9, le pic d'absorption se situe à 3,7. Wurtz (1969) trouve un pH i de 3,9 pour le V.M.T., souche commune de Strasbourg, et de 3,7 pour une souche TC thermorésistante. La valeur du point isoélectrique est bien caractéristique du V.M.T.

c) Coefficient de sédimentation

La détermination de la constante S de sédimentation de cette préparation de V.M.T. a été réalisée à l'ultracentrifugeuse analytique BECKMAN Spinco E. au Laboratoire de virus des plantes de Strasbourg. Après deux mois de conservation de la suspension virale non congelée, le profil de sédimentation présente deux pics de valeur 178 S et 212 S (Fig. 4-A). Le premier pic correspond bien à la valeur donnée pour le V.M.T. dans la littérature. Le deuxième, de valeur plus élevée, pourrait être dû à un phénomène d'agrégation de particules. Kassanis et Bastow (1971) observent également un deuxième pic à 212 S avec la souche TC de V.M.T., extraite de plantes cultivées à 20°.





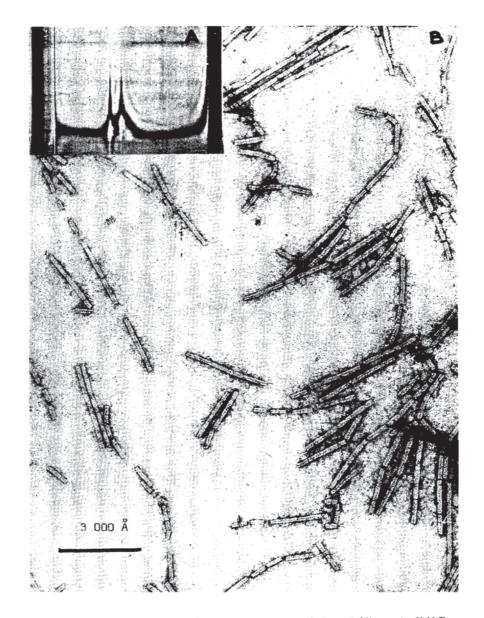


FIGURE 4. — A. Diagramme d'ultracentrifugation analytique Schlieren du V.M.T.: photographie prise 12 minutes après que le rotor ait atteint la vitesse de 23 150 rpm: sédimentation de la gauche vers la droite.

B. Virus de la Mosaïque du tabac (microscope électronique SOPELEM 75 S. grossissement 80 000 environ),

2. - Estimation de la teneur en virus par l'utilisation d'antisérum spécifique.

Le sérum anti-V.M.T. a été fourni par le Laboratoire des virus des plantes de Strasbourg. La précipitation du virus-antigène par l'anticorps se fait en milieu liquide : 0,50 ml de suspension de virus, dans le tampon phosphate 0,01 M + NaCl à 0,9 % à pH 7.0, sont additionnés de 0,15 ml de sérum pur. La précipitation s'effectue pendant 24 heures à + 4°C. La teneur en protéine du précipité obtenu après 3 lavages par 2 ml de tampon phosphate-NaCl est évaluée suivant la méthode de Lowry et al. (1951).

Des concentrations connues et croissantes de suspension de virus purifié donnent des précipités avec le sérum anti-V.M.T., précipités dont la teneur en protéine augmente suivant une courbe (Fig. 5), dite courbe étalon, pouvant être ensuite utilisée pour évaluer la teneur en V.M.T. de tout extrait végétal.

3. - Microscopie électronique.

Nous avons utilisé la technique de coloration négative de Brenner et Horne (1959) avec l'acétate d'uranyle. Une goutte de la suspension de virus, dont la concentration est comprise entre 0,2 et 2 mg/ml, est déposée sur une grille-support recouverte d'un film formvar-carbone. L'excès de liquide est enlevé avec un papier filtre, puis une goutte d'acétate d'uranyle à 1 % est déposée et laissée en contact une minute environ. L'excès de colorant est également enlevé. La grille est alors placée dans un microscope électronique SOPELEM 75 S. Le virus observé (Fig. 4-B) contient une

majorité de bâtonnets de 3 000 Å de long et 150 Å de diamètre, ce qui correspond bien aux caractéristiques du V.M.T. (Fig. 6).

IV. - CONCLUSION

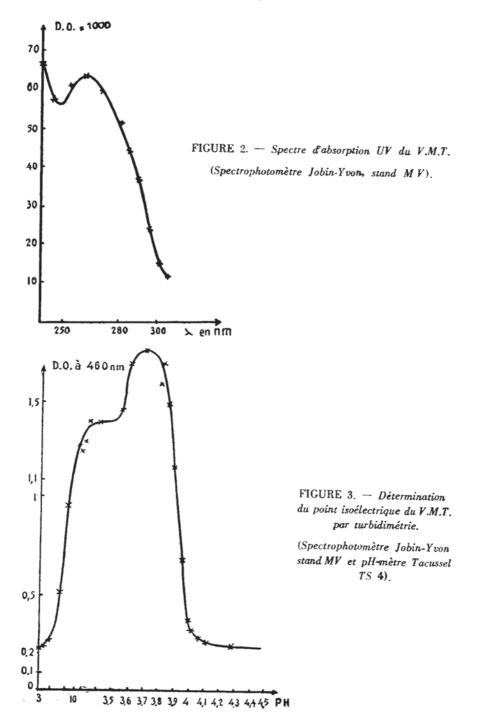
A partir de feuilles de tomate prélevées dans une culture de la région de Tananarive, une souche de V.M.T. a pu être transmise mécaniquement à du tabac, puis purifiée et caractérisée par microscopie électronique, sérologie, point isoélectrique et coefficient de sédimentation. Des expériences en cours permettront peut-être de préciser s'il s'agit ou non d'une souche adaptée à des conditions de température élevée.

REMERCIEMENTS

Nous remercions tout particulièrement le Laboratoire des Virus des Plantes, Faculté des Sciences de Strasbourg, d'avoir bien voulu nous fournir le sérum et déterminer le coefficient de sédimentation du virus.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- BAUDIN P. (1968) Présence du virus de la maladie bronzée de la tomate (T.S.W.V.) à Madagascar, Ann. des Epiphyties, 19, 63-73.
- BOURIQUET G. (1946) Les maladies des plantes cultivées à Madagascar, Paris, Lechevalier, 550 p.
- BRENNER S. and HORNE R.W. (1959) A negative staining method for high resolution electron microscopy of viruses. B.B.A., 34, 103-110.
- KASSANIS B. and BASTOW C. (1971) The relative concentration of infective intact virus and R N A of four strains of Tobacco Mosaic Virus as influenced by temperature J. gen. Virol., 11, 157-170.
- LEBEURIER G. et HIRTH L. (1966) Etude du développement de deux souches de virus de la Mosaïque du tabac à différentes températures. Pathol. et Biol., 14, 158-159.
- LUCAS G. (1965) Diseases of tobacco, The Scarecrow Press, N.Y., 778 p.
- LOWRY L.L., ROSEBROUGH N.J. and FARR A.L. (1951) Protein measurement with the Folin phenol reagent. J. Biol. Chem., 193, 265-275.
- MESSIAEN L.M. et LAFON R. (1963) Les maladies des plantes maraîchères. INRA, 331 p.
- OSTER G. (1951) The isoelectric points of some strains of T.M.V., J. Biol. Chem., 190, 55-59.
- WURTZ M. (1969) Propriétés d'un mutant thermorésistant du virus de la Mosaïque du tabac. Thèse Faculté des Sciences de l'Université de Strasbourg, 41 p.



TECHNIQUE DE PURIFICATION DU V.M.T.

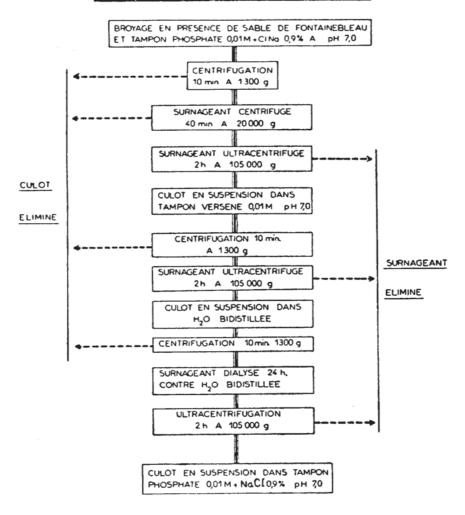


TABLEAU 1. — Technique de purissication du Virus de la Mosaïque du Tabac d'après LEBEURIER et HIRTH (1966)

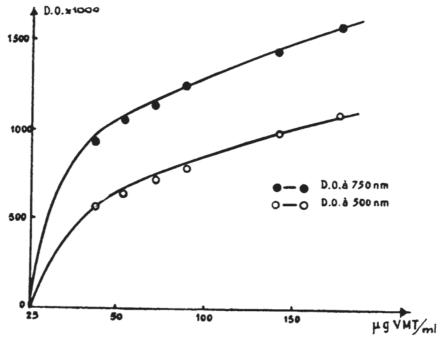


FIGURE 5. — Courbe étalon permettant d'évaluer la teneur en antigène viral à partir d'un précipité antigène (V.M. Le rapticorps (sérum anti-V.M.T.).

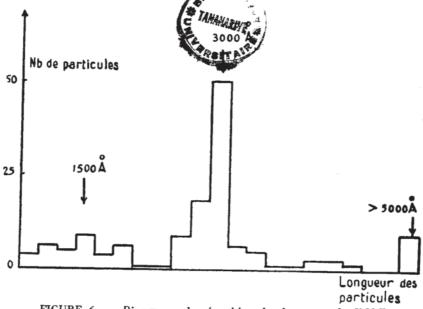


FIGURE 6. — Diagramme de répartition des longueurs du V.M.T. d'après les mesures faites sur clichés de microscopie électronique.