

INITIATION A LA VIROLOGIE DES PLANTES

Rapport de stage
Novembre 1976 Mai 1977

SOUS LA DIRECTION DE
C. FAUQUET
et J. C THOUVENEL



OFFICE DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE ET TECHNIQUE OUTRE-MER

CENTRE D'ADIPODOUMÉ - CÔTE D'IVOIRE

B.P.V 51 - ABIDJAN



JUILLET 1977

OFFICE DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE ET TECHNIQUE OUTRE-MER
CENTRE D'ADIOPODOUME (Côte d'Ivoire)

Laboratoire de Virologie

INITIATION A LA VIROLOGIE DES PLANTES

RAPPORT DE STAGE

de

SAWADOGO ABDOUSSALAM

sous la direction de C. FAUQUET et J.C. THOUVENEL

COPYRIGHT ORSTOM, 1977

JUILLET 1977

PLAN DU RAPPORT

I.	<u>INTRODUCTION.</u>	1
II.	<u>TECHNIQUES CLASSIQUES DE LA VIROLOGIE.</u>	2
	A. <u>Etude des mécanismes de transmission des virus des plantes.</u>	2
	1. Transmission par greffe	
	2. Transmission par cuscute	
	3. Transmission par la graine	
	4. Transmission par inoculation mécanique	
	5. Transmission par les insectes	
	6. Transmission par le sol	
	7. Transmission par voie végétative.	
	B. <u>Symptomatologie et gamme d'hôtes.</u>	5
	1. Symptomatologie	
	2. Gamme d'hôtes.	
	C. <u>Propriétés biologiques.</u>	7
	1. Point de dilution limite	
	2. Résistance à la température	
	3. Résistance à la dessiccation	
	4. Résistance à la température ambiante	
	5. Résistance à la congélation	
	6. Résistance à la réfrigération.	
	D. <u>Purification.</u>	9
	E. <u>Propriétés physico-chimiques.</u>	10
	1. Propriétés des virus	
	2. Propriétés des plantes virosées.	
	F. <u>Sérologie.</u>	12
	1. Préparation des antisérums	
	2. Procédés d'identification sérologiques.	
	G. <u>Microscopie électronique.</u>	13
III.	<u>QUELQUES RESULTATS EXPERIMENTAUX SUR L'ETUDE D'UN VIRUS DU HARICOT.</u>	14
	A. <u>Symptomatologie.</u>	14
	B. <u>Gamme d'hôtes.</u>	15
	C. <u>Propriétés biologiques</u>	16
	D. <u>Expérience de transmission par pucerons.</u>	16
	E. <u>Expérience de transmission par graine.</u>	17
	F. <u>Sérologie.</u>	17
	G. <u>Purification.</u>	18

IV.	<u>ESSAIS D'IDENTIFICATION DE VIRUS FILAMENTEUX DE LEGUMINEUSES.</u>	20
	A. <u>Introduction.</u>	20
	B. <u>Gamme d'hôtes.</u>	21
	C. <u>Essais de transmission par pucerons.</u>	22
	D. <u>Conclusion.</u>	23
V.	<u>BIBLIOGRAPHIE.</u>	24
VI.	<u>CONCLUSION GENERALE.</u>	26

I. INTRODUCTION.

Depuis 1898, plus de 400 virus des plantes ont été décrits et dénommés. Les maladies causées par ces virus sont nombreuses et occasionnent chaque année des pertes importantes dans les cultures vivrières et commerciales. Il devient donc nécessaire de nos jours, de bien connaître et différencier ces maladies, en vue de leur contrôle éventuel dans un programme de protection des végétaux.

C'est à ce travail d'apprentissage des méthodes et techniques d'étude d'identification des virus des plantes et des maladies qu'ils causent, que nous avons consacré cette période de six mois passés au laboratoire de Virologie à Adiopodoumé.

Nous exposerons successivement les techniques classiques de la Virologie des plantes couramment employées, techniques qui ont été utilisées dans l'étude d'une maladie à virus sur haricot ainsi que sur quelques maladies à virus de légumineuses. Enfin nous rapporterons quelques ouvrages de virologie fréquemment consultés au cours de ce stage.

II. TECHNIQUES CLASSIQUES DE LA VIROLOGIE.

A. Etude des mécanismes de transmission des virus des plantes.

Le caractère de transmissibilité est une propriété fondamentale des virus comme des autres êtres biologiques qui causent des maladies.

Le pathologiste est concerné par la transmissibilité des virus à la fois au point de vue pratique en essayant d'éviter ou de circonscrire la transmission naturelle, et au point de vue expérimental car la plus grande partie de la recherche virologique dépend de la transmission du virus dans des conditions contrôlées.

1. Transmission par greffe.

Le greffage est la méthode de transmission des virus universellement applicable, nécessitant seulement que le virus détermine une infection systémique, dans les plantes où on essaye de le transmettre. A l'origine, la greffe est une pratique horticulaire ancienne.

Nous avons effectué un essai de transmission par greffage au cours de ce stage.

Sur la parcelle tomate du S.E.B. (Service d'Expérimentation Biologique) de l'ORSTOM, on pouvait observer des symptômes de déformations, d'enroulement foliaires et de renversement de la flèche, des pieds de tomates taillés au stade début de production. De tels symptômes qui affectent la parcelle à plus de 90% peuvent être dûs à une maladie virale ; cette maladie n'étant pas transmissible mécaniquement nous avons essayé la greffe de boutures malades sur des plantes saines. Nous avons tenté un seul essai de transmission de ces symptômes par greffe et les greffons n'ayant pas pris le résultat a été négatif. Un essai unique est insuffisant, il faudrait effectuer plusieurs séries de greffage avant de tirer une conclusion sur ce point.

2. Transmission par cuscute.

La transmission des virus par greffe se révèle difficile et même impossible entre des plantes de familles éloignées par incompatibilité organique. En partie, cette difficulté peut être résolue par la transmission par cuscute. La cuscute en effet est une plante parasite sans chlorophylle de la famille des Convolvulacées ; elle parasite les plantes supérieures en s'enroulant autour d'elles et en formant des suçoirs qui entrent en communication avec le tissu vasculaire de l'hôte ce qui permet le transfert des virus à de nouveaux hôtes.

3. Transmission par graine des virus des plantes.

La possibilité de transmission des viroses par les graines des plantes malades a été admise dès les premiers travaux de virologie. De nos jours on connaît un grand nombre de virus transmis par la graine dont le virus de la mosaïque du concombre, le virus 1 du haricot, la mosaïque de la laitue... Le taux de transmission par la graine est extrêmement variable depuis 1 pour 10.000 jusqu'à 75%.

4. Transmission par inoculation mécanique.

Une grande partie de la connaissance des virus des plantes repose sur l'inoculation mécanique. Plusieurs procédés se rattachent à cette méthode qui a beaucoup évolué depuis le début. Comme procédés courants on peut noter le frottement, la pulvérisation, l'injection et la piqûre. On utilise pour cela du jus brut infectieux obtenu par broyage du matériel végétal dans du tampon qui permet d'éviter la dégradation des particules virales par oxydation ou du fait d'une variation importante du pH.

Le tampon le plus couramment utilisé au laboratoire de Virologie à Adiopodoumé présente la composition suivante :

K ₂ H PO ₄	1,5 g)	} pH 7
KH ₂ PO ₄	0,25g)	
Chlorhydrate de Cystéine	0,35g	
Bentonite	0,25g	
eau bidistillée	100 ml.	

Le tampon phosphate permet de maintenir le pH du broyat lors de la libération d'acides contenus dans les vacuoles des cellules. Le Chlorhydrate de Cystéine empêche l'oxydation sous ses diverses formes.

Enfin la bentonite a pour rôle de fixer les protéines et en particulier les RNAses qui pourraient dégrader le virus.

Nous avons utilisé le procédé d'inoculation mécanique par frottement. Pour faciliter la pénétration du virus dans la plante on utilise un abrasif qui a pour rôle de créer de fines blessures non léthales sur les feuilles : la célite (poudre de diatomées) et le Carborundum (carbure de Silicium) sont deux exemples d'abrasifs.

Le procédé par pulvérisation sous pression semble utilisé surtout en champ pour des grandes populations de plantes. Ce procédé utilisé avec les types d'appareils d'Agriculture n'est pas d'une haute infectivité mais représente une méthode rapide d'élimination d'une grande partie de la population sensible ; il peut être amélioré par incorporation du Carborundum dans l'inoculum.

Le procédé par piqûre peu courant, est utilisé pour certaines maladies pour lesquelles il semble le meilleur sinon le seul pour la transmission mécanique. Il est indiqué surtout pour certains virus étroitement associés au phloème des plantes et incapables de se multiplier dans les tissus épidermiques ou de traverser l'épiderme. Il consiste à piquer les tissus de la plante à inoculer à l'aide d'aiguilles infectées.

Le procédé par injection consiste à injecter hypodermiquement des extraits infectieux dans les tiges des plantes.

Quel que soit le procédé employé, la réussite de la transmission mécanique dépend de plusieurs facteurs :

1. la sensibilité de la plante inoculée (certaines espèces de plantes semblent présenter une sensibilité à de nouveaux virus et sont utilisées assez couramment en recherche. On peut citer *Phaseolus vulgaris*, *Nicotiana tabacum*, *Cucumis sativus*, *Chenopodium amaranticolor*...).

2. de l'éclairage (les faibles intensités de lumière, l'ombrage et l'obscurité augmentent la sensibilité des plantes).
3. de l'âge de la plante (il est conseillé d'utiliser les plantes au stade feuilles cotyledonnaires)
4. de la nutrition des plantes (les plantes jeunes et vigoureuses sont sensibles d'une façon générale et il apparaît aussi que certains ions $P04^{--}$, K^+ , $N...$ augmentent ou abaissent la sensibilité suivant le cas),
5. de la concentration de l'agent infectieux,
6. de la présence de substances inhibitrices d'infection, tanins, mucopolysaccharides... Les virus transmissibles mécaniquement sont relativement nombreux et très bien étudiés.
Un virus du haricot que nous avons étudié est également transmissible mécaniquement.

5. Transmission par les insectes.

Un grand nombre de virus (la moitié environ) se transmettent par des insectes. Ces insectes appartiennent à divers ordres dont le plus important est celui des Homoptères (cicadelles et pucerons). La plupart de ces insectes vecteurs sont du type piqueurs (Thysanoptères, Hétéroptères et Homoptères). On identifie des vecteurs aussi parmi les insectes broyeurs : Coléoptères, Acridiens et Forficules.

a) les insectes piqueurs.

L'insecte devient infectieux à la suite d'une prise de nourriture sur la plante virosée. Il transmettra ce virus lors d'une alimentation ultérieure sur une plante saine. Les transmissions ont lieu suivant deux modes principaux :

- le mode non persistant : l'insecte acquiert le pouvoir infectieux dès qu'il a piqué une plante malade. Il ne le conserve que peu de temps, c'est le cas le plus fréquent : virus de la mosaïque de l'igname, virus de la panachure du poivron...

- le mode persistant : l'insecte n'acquiert le pouvoir infectieux qu'après une incubation assez longue, après qu'il ait piqué la plante malade ; il reste infectieux très longtemps, souvent pendant toute sa vie.

C'est le cas du Virus de la Rosette verte ou chlorotique de l'arachide par pucerons
du Virus du manioc par Aleurodes
du Virus de la mosaïque du maïs par Cicadelles.

Le virus du haricot que nous avons étudié est transmis par pucerons selon le mode non persistant.

b) Les insectes broyeurs.

Ce type de transmission est strictement mécanique. Les particules de virus adhèrent aux pièces buccales de l'insecte qui les transmettra à une plante saine dont il se nourrit. Le virus X de la pomme de terre est transmis de cette manière par une espèce d'Acrididae. En Afrique il y a le virus de la mosaïque du Gombo (OMV), le virus du riz (RYMV) transmis par Chrysomélides.

6. Transmission par le sol.

Certains virus sont transmis par des êtres vivant dans le sol, tels que les nématodes ou les champignons inférieurs (Olpidiacées, Synchytriacées et Plasmodiophoracées).

Exemples :

. Les virus du groupe des ringspots des arbres fruitiers et de la vigne sont transmis par des nématodes appartenant au genre *Xiphinema*. Le nématode *Trichodorus* transmet le virus du Tobacco Rattle et celui du Tomato black-sing.

. Une souche particulière du champignon *Olpidium brassicae* est le vecteur obligatoire du Big vein de la laitue et du stunt (nanisme) du tabac. *Polymyxa graminis* est vecteur d'un virus du blé ainsi que du rabougrissement de l'arachide.

7. Transmission par voie végétative.

Les virus peuvent se transmettre d'une génération à l'autre par les organes de multiplication végétative : bulbes, rhizomes, tubercules, stolons et boutures.

Comme exemples qui sont en étude au laboratoire de Virologie à Adiopodoumé on peut citer le virus de la mosaïque africaine du manioc transmis par boutures, le virus de la mosaïque de l'igname transmis par tubercules.

B. Symptomatologie et gamme d'hôtes.

Le premier objectif des études de gamme d'hôtes et de symptomatologie est de pouvoir caractériser un virus à identifier, comme capable ou non d'induire des réactions locales ou systémiques sur des plantes hôtes sélectionnées sur la base de leurs réactions à des virus connus. Une telle information est très importante pour les étapes ultérieures de l'identification ; en premier lieu, elle peut donner directement l'identité du virus ou au moins ramener l'investigation à un nombre réduit de possibilités, et permettre ainsi des tests plus spécifiques. En second lieu, l'information sur la symptomatologie et la gamme d'hôtes est une donnée qu'il faut toujours posséder pour la détermination finale au niveau de la souche. Le second objectif important est la découverte d'un test adéquat ou plante indicatrice qui réagisse localement et quantitativement.

1. La symptomatologie.

L'activité d'un virus dans un végétal peut entraîner l'apparition de symptômes particuliers localisés ou systémiques.

a) Les symptômes localisés : ils sont caractérisés par une réaction d'hypersensibilité de la plante hôte en limitant l'infection virale à l'endroit inoculé. Le virus du haricot que nous avons étudié induit des lésions locales nécrotiques sur *Phaseolus mungo* et des lésions locales chlorotiques sur *Cucumis sativus*.

b) Les symptômes systémiques : ils apparaissent d'abord sur les organes les plus jeunes ou bien sur ceux inoculés, puis gagnent tout le végétal. On peut distinguer entre autres les mosaïques, les panachures, les spottings, les chloroses, les nécroses, les déformations foliaires et les rabougrissements.

- Les mosaïques. Elles consistent en des alternances de plages colorées en jaune, vert clair et vert foncé qui se dessinent sur le limbe foliaire ; on peut citer ici la mosaïque du concombre (Cucumber mosaic), la mosaïque du tabac (Tabacco mosaic), la mosaïque du haricot (bean mosaic)...

- Les panachures, ou "mottles", sont des décolorations foliaires ou florales ; c'est le cas du mottle du poivron et du piment (Pepper veinlet mottle).

- Les spottings sont des taches de coloration vert foncé ou au contraire de décoloration jaune. Ces taches sont rondes et de tailles variables.

- Les chloroses. Elles consistent en un éclaircissement et un jaunissement des tissus foliaires, pouvant apparaître sur toute la feuille ; on peut retenir ici la chlorose de l'épinard due au virus de la mosaïque du concombre.

- Les nécroses. Ce sont de larges lésions brunâtres, blanchâtres ou rougeâtres provoquées par la mort des tissus ; c'est le cas de la nécrose du poivron attaqué par le virus de la mosaïque du tabac.

- Les déformations foliaires. Le virus se multipliant dans les jeunes feuilles induit des déformations dans la morphologie de la feuille. Le virus de la mosaïque du concombre sur tomate provoque la formation de feuilles effilées.

- Les rabougrissements. La plante est atteinte de nanisme résultant d'un raccourcissement des entre-noeuds. Ce type de symptôme s'observe chez la tomate atteinte par le "Tomato stunt", le "bunshy top" ou le "Stolbur virus". On le rencontre également chez l'arachide atteinte du rabougrissement ou de la rosette.

2. La gamme d'hôtes.

La gamme d'hôtes regroupe les plantes-tests ou plantes indicatrices dont les réactions caractérisent tel ou tel virus. Une bonne gamme d'hôtes doit permettre le test et l'étude de la multiplication du virus pour la détermination de ses propriétés biologiques dans le jus brut. Une bonne plante test doit être celle qui développe des symptômes distincts tôt après inoculation, et à croissance rapide. Pour les inoculations mécaniques, la plante à lésions locales est de loin la meilleure plante-test.

Comme exemple de gamme d'hôtes nous donnerons celui du Virus de la Mosaïque du Tabac (VMT) que nous avons identifié sur des échantillons de tomates ramenés de tournée...

Plantes hôtes	Symptômes
- <i>Chenopodium amaranticolor</i>	- lésions locales chlorotiques isolées devenant coalescentes et entraînant une nécrose générale de la feuille.
- <i>Nicotiana tabacum samsun</i>	- mosaïque systémique
- <i>Nicotiana tabacum xanthi</i>	- lésions locales nécrotiques
- <i>Capsicum annuum</i>	- lésions locales nécrotiques et chute des feuilles, nécrose apicale
- <i>Nicotiana megalosiphon</i>	- réaction systémique avec nécrose
- <i>Nicotiana glutinosa</i>	- lésions locales nécrotiques
- <i>Lycopersicum esculentum</i>	- mosaïque
- <i>Tetragona expansa</i>	- spots jaunes
- <i>Solanum melongena</i>	- mosaïque
- <i>Datura innoxia</i>	- lésions locales nécrotiques
- <i>Vigna sinensis</i>	- lésions locales nécrotiques pour certaines souches, rien pour d'autres.

C. Les propriétés biologiques.

Encore appelées constantes biologiques, elles expriment la réaction des virus à l'égard des facteurs physiques et chimiques auxquels ils sont soumis. La confrontation des valeurs obtenues avec des données établies peut permettre de résoudre certains problèmes d'identification. Ces propriétés propres à chaque type de virus sont déterminées à partir du jus brut infectieux de la plante virosée. Les plus couramment étudiées sont les suivantes :

- le point de dilution limite
- la résistance à la température
- la résistance à la dessiccation
- la résistance à la congélation
- la résistance à la température ambiante
- la résistance à la réfrigération.

1. Le point de dilution limite.

Il est défini comme étant la dilution limite à partir de laquelle la quantité de matériel infectieux devient trop faible dans le milieu pour pouvoir déterminer une infection. On peut déterminer le point de dilution limite de la façon suivante :

De l'eau distillée ou du tampon est réparti dans des tubes à essais à raison de 9 ml par tube. On extrait du jus brut du végétal malade présentant des symptômes. On prélève 1 ml que l'on transfère dans l'un des tubes d'essais contenant 9 ml ; le

jus brut a donc été dilué 10 fois. De cette dilution on transfère 1 ml dans un autre tube à essais contenant 9 ml, l'on obtient un jus dilué 100 fois. On continue ainsi l'opération à partir de la dernière dilution à chaque fois. On inocule ces différentes dilutions à un hôte sensible de préférence à lésions locales. Le jus brut dilution 0 servant de témoin, les réactions indiquent à quel moment le jus perd son pouvoir infectieux.

2. La résistance à la température.

Les virus n'ont pas du tout le même comportement à l'égard de la température. L'élévation de la température d'une suspension de virus provoque une inactivation irréversible de l'agent infectieux lorsqu'il atteint le niveau thermal d'inactivation. Ce niveau caractéristique de chaque type de virus est celui à partir duquel il y a désintégration des particules infectieuses et perte du pouvoir pathogène du virus. Il se situe généralement entre 42°C et 92°C. Le point de thermo-inactivation peut être déterminé de la façon suivante :

On remplit une série de tubes à hémolyse de 2 ml de jus infectieux. Ces tubes sont successivement immergés pendant 10 mn dans un bain-marie thermostaté à une température donnée, puis refroidis immédiatement dans de la glace. Un tube non chauffé servant de témoin, on inocule l'ensemble à des plantes tests et les réactions permettent d'établir la température à partir de laquelle le virus perd son pouvoir pathogène. Le point de thermo-inactivation du VMT est de 90°C.

3. La résistance à la dessiccation.

La dessiccation des feuilles provoque l'inactivation plus ou moins rapide de la plupart des virus. Le virus de la mosaïque du tabac se révèle posséder une capacité de résistance très longue. Le temps de résistance à la dessiccation peut être évalué en laissant sécher naturellement des feuilles malades, et à en prélever de temps à autre une partie que l'on inocule à des plantes tests. Les réactions sont notées et l'on repère le moment à partir duquel l'inoculum cesse d'être infectieux. Ce renseignement est très précieux car il permet de connaître le comportement des virus dans la nature.

4. La résistance à la température ambiante.

On se contente en général de la température qui règne au laboratoire et qui tourne autour de 25°C. Pour la détermination on se sert de tubes à hémolyse contenant 2 ml de jus infectieux. On les laisse à la température du laboratoire et à périodicité déterminée, un tube est prélevé, inoculé à une plante indicatrice. L'opération est poursuivie jusqu'à perte de pouvoir infectieux de l'inoculum. On exprime en heures, jours, semaines, mois ou années ce temps de résistance à la température ambiante.

5. La résistance à la congélation.

Le temps de résistance à la congélation varie lui aussi suivant le type de virus ; le procédé de détermination reste le même que celui pour la résistance à la température ambiante. Les tubes à hémolyse contenant chacun 2 ml de jus brut infectieux sont mis à congeler (-20°C). Des inoculations périodiques sont réalisées et la perte du pouvoir infectieux est obtenue lorsqu'aucune réaction ne fait suite aux inoculations sur une plante indicatrice.

6. La résistance à la réfrigération (+4°C).

Comme pour la détermination des données précédentes, le jus brut infectieux est mis dans des tubes à hémolyse. Ces tubes sont gardés au frigidaire à une température avoisinant +4°C. De la même façon, l'on procède à des inoculations périodiques qui permettront de déterminer le temps au bout duquel le jus perd son pouvoir infectieux.

L'ensemble des données biologiques ainsi recueillies permet de caractériser le virus que l'on étudie et de le comparer aux résultats des virus déjà décrits. Ils permettent souvent de déterminer le mode de conservation du matériel végétal pour étudier plus profondément ce virus.

D. La purification.

C'est la technique qui effectuée sur du matériel végétal malade permet d'obtenir une suspension de virus purifié, débarrassé de tous les débris végétaux et autres impuretés issues des organites cellulaires. Le virus purifié peut servir à la fabrication d'antisérums, à l'observation microscopique du virus, à l'étude des propriétés physico-chimiques, à l'inoculation artificielle... différents résultats qui aideront en définitive à une identification sans ambiguïté de ce virus.

La technique de purification qui est spécifique à chaque type de virus est souvent longue et implique de nombreuses opérations. A chaque type de virus il correspond une méthode de purification ; nous donnerons comme exemple celle employée pour un virus de Riz : le Rice yellow mottle virus qui est un virus rond.

1. Broyage. Le riz malade est broyé dans 10 volumes de tampon phosphate de sodium 0,1 M pH 5 contenant 0,2% de mercapto-éthanol.
2. Pressage du broyat à travers plusieurs couches de gaze.
3. Clarification du jus brut au chloroforme 25% pendant 15 mn.
4. Centrifugation du mélange pendant 10 mn à 4.000 g.
5. Récupération du surnageant.
6. Précipitation des grosses protéines par 20% de sulfate d'ammonium, élimination de ces protéines par centrifugation.
7. Précipitation du virus par addition de 20% supplémentaire de sulfate d'ammonium.
8. Précipitation du virus par 20 mn de centrifugation à 15.000 g.
9. Remise en suspension du virus dans du tampon de broyage.
10. Elimination des protéines non dissolubles par une basse centrifugation.
11. Concentration du virus par une ultracentrifugation de 75 mn à 48.000 rpm.
12. Remise en suspension du culot dans un faible volume de tampon phosphate 0,01 M pH 7.
13. Elimination du matériel insoluble par une faible centrifugation.

E. Les propriétés physico-chimiques.

En Virologie il faut considérer deux choses ; soit que l'on étudie la plante avec ses caractéristiques soit que l'on étudie le virus en tant que tel.

1. Les propriétés des virus.

a) Formes et dimensions des virus.

Les virus des végétaux peuvent se classer en cinq groupes importants si on se réfère à leur forme :

- les virus en bâtonnets. Leur forme est rigide et allongée les faisant ressembler à des bâtonnets. L'exemple typique est celui de la Mosaïque du tabac.

- les virus sphériques ou isométriques. La capsid est une sphère parfaite dans laquelle se trouve l'ARN. L'exemple caractéristique est la Mosaïque du Concombre, leur taille varie de 15 nm de diamètre jusqu'à 100 nm.

- les virus bacilliforme : ils sont la forme d'une bactérie, l'exemple est le virus de la Mosaïque de la Luzerne.

- les virus filamenteux. Ils sont certainement les plus nombreux, leur longueur varie entre 600 et 3000 nm mais la fréquence est 750 nm. L'exemple est le virus Y de la Pomme de terre.

- les virus en forme de boulet de canon. Ces virus plus complexes avec deux enveloppes protéiques sont peu fréquents et ont la particularité de se multiplier dans leur vecteur. Exemple, la Mosaïque du maïs.

Bien sûr cette classification est schématique et la véritable classification des virus des plantes se réfère à d'autres critères comme la vection, la teneur en ARN... Les virus des plantes sont excessivement simples dans leur constitution : leur information génétique est portée par un acide le plus souvent ribonucléique (ARN) qui est protégé par une enveloppe protéique ou capsid. Les virus des plantes sont parmi les plus petits virus par rapport aux virus animaux.

b) Techniques utilisées pour caractériser les virus.

Différentes méthodes sont utilisées en Virologie pour caractériser les virus : la spectrophotométrie est l'absorption caractéristique des virus dans l'ultra-violet ; la vitesse de sédimentation obtenue par une centrifugation accélérée et qui renseigne sur la constante de sédimentation à une température donnée, la diffusion qui est la vitesse de transfert pour les particules se trouvant dans de l'eau à 20°C et qui s'exprime par la constante de diffusion, la mesure de la viscosité pour les suspensions très pures de virus, la microscopie électronique qui permet une observation directe des particules, mobilité électrophorétique et point isoélectrique; l'électrophorèse est une méthode dont le principe repose sur le fait que certaines substances se déplacent lorsque soumises à un champ électrique. Le champ entraîne la séparation des divers constituants en fonction de leur vitesse de migration respective. C'est cette vitesse qui

est appelée mobilité électrophorétique. La migration vers l'anode ou la cathode dépend de la concentration en ions hydrogène du milieu c'est-à-dire du pH. Il existe une valeur du pH pour laquelle il n'y a pas de déplacement. C'est la valeur du point isoélectrique. Ces deux valeurs sont caractéristiques pour chaque virus.

2. Les propriétés des plantes virosées.

Ces propriétés encore appelées "tests-biochimiques" sont des procédés de détection et de caractérisation de maladies virales bien connues.

Les tests biochimiques en Virologie sont basés sur le fait que diverses modifications apparaissent chez les plantes au cours de l'infection virale. Ces modifications consistent soit en l'apparition de substances nouvelles, soit en la stimulation de la production de substances normalement présentes et non pathogènes. Les méthodes envisagées sont diverses : colorimétrie, spectrophotométrie, chromatographie, électrophorèse, précipitation...

a) Les procédés colorimétriques font apparaître les produits de la réaction de l'hôte à l'attaque du virus. On peut citer à ce sujet le procédé de contrôle de l'état sanitaire pour la pomme de terre : la présence du virus de l'enroulement de la pomme de terre est prouvée par la réaction de coloration bleue que fait apparaître le jus brut de plantes infestées traité avec le réactif de Dische à chaud ou avec la diphénylamine ; le jus de plantes saines traité dans les mêmes conditions donne une coloration verte.

b) Par la spectrophotométrie on a pu mettre directement en évidence, chez les végétaux virosés, des substances qui seraient les constituants des virus eux-mêmes. Les virus étant des nucléoprotéines, ont la propriété d'absorber certaines radiations situées dans la zone de l'ultra-violet. L'examen des courbes d'absorption obtenues permet de déduire si oui ou non le matériel étudié est sain ou virosé.

c) La chromatographie et l'électrophorèse ont été également utilisées à l'identification biochimique des virus des plantes : le virus de la Mosaïque du tabac a pu être détecté par chromatographie sur papier dans des extraits de ce végétal ; l'emplacement du virus chromatographié a été révélé à l'aide d'un réactif à l'Arginine. Par la chromatographie et l'électrophorèse sur papier on a aussi recherché un test de détection du virus de l'enroulement de la Pomme de terre ; on a pu ainsi découvrir l'accroissement du taux de protéines totales et du nombre de fractions protéiques dans les échantillons contaminés. L'électrophorèse sur papier a servi de moyen de détection du virus X de la pomme de terre dans les tubercules de cette plante hôte.

d) La précipitation a été aussi utilisée comme méthode de diagnostic. On retiendra à ce sujet la réaction par précipitation pour la détection du VMT et du virus X de la pomme de terre, à l'aide du Ncl ou de l'acide lactique comme agents précipitants.

F. La Sérologie.

La découverte du caractère antigénique des virus des plantes a permis l'élaboration de cette méthode d'identification.

En effet des substances étrangères appelées antigènes provoquent dans l'organisme de certains animaux où elles sont introduites, l'apparition d'autres substances appelées anticorps. Les corps qui sont susceptibles d'induire une telle réaction sont le plus souvent des protéines, des polyaccharides. Les anticorps sont des protéines généralement du groupe des globulines. L'anticorps et l'antigène qui l'a induit, mis en présence l'un de l'autre, réagissent spécifiquement et la réaction peut être mesurée *in vitro* par divers procédés. De cette façon un antigène (un virus par exemple) peut être détecté et identifié par son anticorps.

On appelle antisérum ou immurisérum un sérum qui contient des anticorps spécifiques d'un antigène. En virologie un sérum normal est un antisérum réagissant avec les protéines de la plante non virosée ; un antisérum est homologue à l'égard de l'antigène qui l'a induit et hétérologue envers tous les autres antigènes. Le titre d'un antisérum est la plus grande dilution à laquelle chacun de ceux-ci est capable de réagir respectivement avec une quantité déterminée de son homologue.

1. Préparation des antisérums.

Différentes étapes interviennent au cours de la préparation des antisérums qui vont de la recherche du bon végétal source pour le virus à la bonne purification du virus puis à son injection à l'animal destiné à fournir l'antisérum.

Après une bonne identification, une parfaite purification du virus débarrassé des éléments normaux de la plante, l'antisérum est obtenu par injections périodiques du jus virosé dans un lapin. Après la formation des anticorps, le sang de l'animal est récolté et on en recueille le sérum par centrifugation après coagulation. Le contenu en anticorps est contrôlé en présence de l'antigène correspondant, le titre déterminé ; le sérum est conservé en le diluant de moitié avec du Glycérol ou en le congelant.

2. Les procédés d'identification sérologiques. Ils sont nombreux, nous donnerons ici les plus utilisés.

a) La réaction de précipitation qui est couramment utilisée part du principe suivant : quand une préparation d'un virus est mise en présence de son antisérum spécifique, un précipité apparaît, qui peut être observé de diverses façons :

- Précipitation en tubes qui consiste à mélanger dans ces tubes en verre, du jus végétal à tester, préalablement centrifugé, avec son antisérum. Le mélange est placé en incubation à température déterminée, dans un bain d'eau. L'apparition d'un précipité indiquera que la réaction est positive.

- Précipitation sur lames est basée sur le même principe précédent. Elle consiste à mélanger sur une lame porte objet, une goutte de jus végétal avec une goutte d'antisérum. Après une incubation pendant quelques minutes, l'apparition d'un précipité d'aspect floconneux signifie que le test est positif. Le précipité peut être bien observé à la loupe binoculaire ou au microscope sur fond noir. Cette technique est très rapide et convient parfaitement aux essais en grandes séries.

- Précipitation en boîtes de Pétri : ici les réactions sont réalisées respectivement à partir de jus clarifié et non clarifié, sur le fond d'une boîte de Pétri recouvert d'un mince film transparent d'un produit hydrofuge, le "Formvar". Ce dernier a pour rôle d'empêcher l'étalement des gouttelettes formées par le mélange antisérum et anticorps ; les gouttelettes sont ensuite recouvertes avec précaution d'une couche d'huile de paraffine qui empêche l'évaporation des gouttelettes.

- La méthode de la double diffusion. Sans aucun doute est la méthode la plus utilisée en virologie classique. La technique consiste à faire des réservoirs dans une couche d'agarose à 0,6% dans lesquels on dépose l'antisérum d'une part et l'antigène d'autre part. Ces substances migrent par diffusion dans le gel d'agarose et lorsqu'elles se rencontrent il y a précipitation et formation d'une bande visible. Cette technique permet d'identifier sans aucun doute possible les virus et même de savoir s'il s'agit de la même souche ou non. L'inconvénient de cette méthode est qu'elle ne marche bien qu'avec les virus sphériques.

b) La neutralisation du pouvoir infectieux : ce procédé par de la constatation suivante : un virus mis en présence de son sérum homologue précipite, et le mélange inoculé à des plantes-tests du virus considéré ne manifeste plus de pouvoir infectieux. On dit qu'il y a neutralisation du pouvoir infectieux.

G. La microscopie électronique.

La microscopie électronique est capable de donner les renseignements suivants sur les particules virales: la taille de la particule, sa forme, sa structure interne et externe, des états d'aggrégation ou de cristallisation, des analyses quantitatives de suspensions de virus.

Une méthode couramment utilisée pour la détection rapide de virus dans les plantes malades est la dip method ou "dipping". Elle consiste à déposer une goutte de jus brut sur une grille de microscopie électronique carbonée. On réalise ensuite une coloration négative à l'acétate d'Uracycle ou au formiate d'Uracycle ou encore au phosphotunstate. Il faut cependant préciser que la dip method est applicable surtout aux virus à particules allongées, car les jus non purifiés des plantes malades contiennent des constituants normaux des cellules qui sont essentiellement de forme sphérique et de même gamme de taille que les virus ronds.

L'isolement du virus et sa purification permettront la préparation d'échantillons à examiner au microscope électronique. Une goutte de la suspension purifiée est déposée sur une grille, recouverte au préalable d'un film de collodion carboné. Les virus sont ensuite colorés négativement (le colorant pénètre dans le virus), avec par exemple de l'acétate d'Uracycle à 0,5%. Les grilles peuvent alors être observées directement au microscope électronique.

III. QUELQUES RESULTATS EXPERIMENTAUX SUR L'ETUDE D'UN VIRUS DU HARICOT.

Il s'agit de la suite de l'étude commencée au cours du trimestre précédent sur une souche de virus désignée GH1 selon le code propre au laboratoire. Cette souche a été isolée de haricot récolté dans la localité de Gagnoa en Côte d'Ivoire, présentant une forte mosaïque.

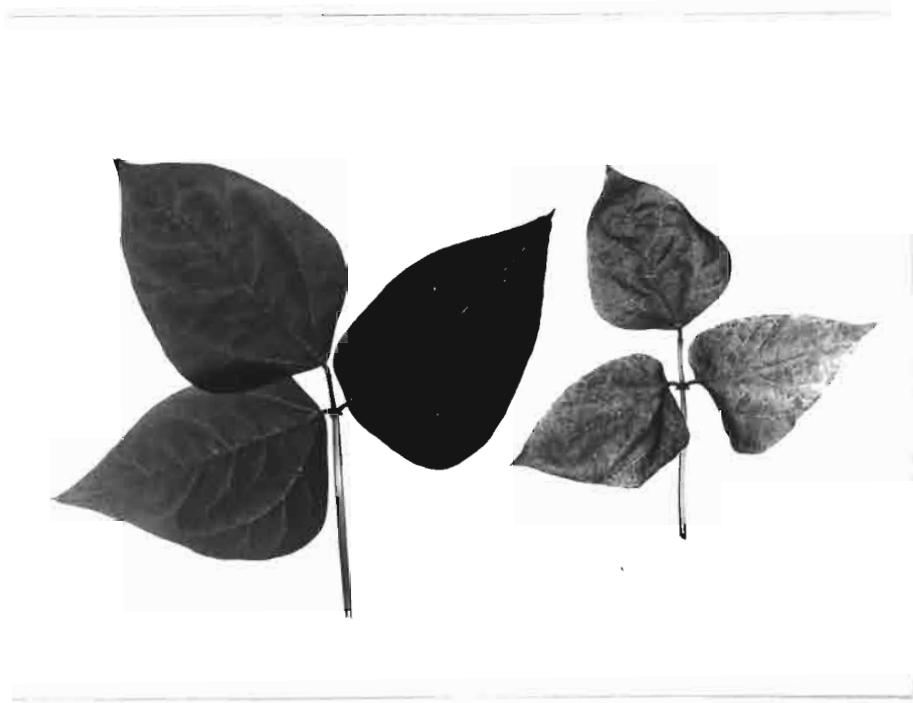
A. Symptomatologie.

Comme plantes tests assez bonnes pour l'expression des symptômes du GH1 on peut retenir les trois espèces suivantes :

- *Phaseolus mungo* qui réagit par des symptômes localisés nécrotiques.
- *Vigna sinensis* black eye répond par des symptômes systémiques de mosaïque vert clair-vert foncé sur les jeunes feuilles ; ces symptômes disparaissent quand les feuilles vieillissent.
- *Nicotiana glutinosa* réagit aussi par des symptômes systémiques de mosaïque vert clair.

B. Gamme d'hôtes.

La gamme d'hôtes suivante a été établie pour le GH1.



- Fig. 1 : Symptômes du virus de la mosaïque du haricot inoculé sur *Vigna sinensis* black eye : à gauche feuille saine, à droite feuille malade à symptômes systémiques.



- Fig. 2 : Symptômes du virus de la mosaïque du haricot inoculé sur *Vigna sinensis* black eye : lésions locales nécrotiques.



- Fig. 3 : Symptômes du virus de la mosaïque du haricot inoculé sur *Phaseolus mungo* : lésions locales nécrotiques.

PLANTES HOTES	SYMPTOMES	Présence éventuelle	
		Locale	Systé- mique
<i>Arachis hypogea</i>	0	-	-
<i>Beta vulgaris</i>	0	-	-
<i>Capsicum frutescens</i>	marbrures et déformations foliaires		+
<i>Chenopodium amaranticolor</i>	lésions locales chlorotiques	+	
<i>Cucumis sativus</i>	ringspots	+	
fève de Séville	ringspots		+
<i>Nicotiana attenuata</i> Torr.	0		+
<i>Nicotiana clevelandii</i>	0		+
<i>Nicotiana benthamiana</i>	légers symptômes		+
<i>Nicotiana hybride chrystie</i>	légers symptômes		+
<i>Nicotiana megalosiphon</i>	0		+
<i>Nicotiana tabacum xanthi</i> nec.	0		+
<i>Nicotiana glutinosa</i>	mosaïque		+
<i>Nicotiana paniculata</i>	0		+
<i>Nicotiana rustica</i>	0	-	-
<i>Nicotiana tabacum</i> Samsun	0		+
<i>Nicotiana tabacum</i> Samsun NN	0		+
<i>Nicotiana texana</i>	0		+
<i>Nicotiana tabacum xanthi</i>	ringspots		+
<i>Nicotiana viscosa</i>	0	-	-
<i>Petunia</i> nain mandarin	0		+
<i>Phaseolus mungo</i>	lésions locales nécrotiques	+	
<i>Physalis floridana</i>	spottings		+
<i>Physalis alkekengi</i>	0	-	-
<i>Pisum sativum</i>	0		+
Soja	lésions locales nécrotiques	+	
<i>Tetragona expansa</i>	ringspots		+
<i>Torenia fournieri</i>	0		+
Tomate	déformations foliaires		+
<i>Vigna sinensis</i> black eye	mosaïque, lésions nécrotiques locales		+
<i>Vigna unguiculata</i>	mosaïque + déformations		+

0 = pas de symptômes

+ = contrôle positif

- = contrôle négatif.

Pour chaque espèce hôte inoculé, il a été effectué un retour vers *Phaseolus mungo* pour s'assurer de la présence éventuelle du virus.

Phaseolus mungo hôte à lésions locales nécrotiques, permet un contrôle rapide et les symptômes s'expriment au bout de 48 heures au maximum. De plus les symptômes sont distincts et permettent une estimation de la concentration de l'inoculum en particules virales. Grâce à ce contrôle rapide sur *Phaseolus mungo* nous avons pu déceler que la plupart des plantes hôtes symptomless contenaient cependant le virus GH1 à des concentrations élevées et pouvaient donc être utilisées comme plantes sources. Ainsi en plus de *Nicotiana glutinosa* et *Vigna sinensis* black eye qui sont des hôtes à réactions systémiques nous avons retenu les hôtes symptomless suivants, comme plantes permettant une bonne multiplication du GH1 ; *Nicotiana tabacum* Samsun NN, *Petunia* nain mandarin, *Torenia fournieri*.

C. Propriétés biologiques.

1. Température de thermoinactivation : 50°C - 55°C
2. Résistance à la congélation (-20°C) : plus de 22 jours
3. Résistance à la réfrigération (-4°C) : non effectuée
4. Résistance à la température ambiante : 48 heures
5. Point de dilution limite : 10^{-2} - 10^{-3} .

Ces résultats sont obtenus à l'issue d'un essai unique et demande à être confirmés par plusieurs séries d'essais.

D. Expérience de transmission par pucerons.

Dix pucerons *Aphis citricola* récoltés sur arachide, ont permis la transmission positive du virus GH1 de *Vigna sinensis* black eye à *Vigna sinensis* black eye au stade feuilles cotylédonaire. Nous avons travaillé avec les conditions suivantes :

- récolte des pucerons qui sont mis au jeun pendant 3 heures
- alimentation des pucerons sur des jeunes feuilles présentant de beaux symptômes pendant 15 minutes
- transfert des pucerons ainsi traités sur des *Vigna sinensis* black eye au stade feuilles cotylédonaire à raison de 10 pucerons par plante
- les pucerons passent la nuit sur les plantes dans le laboratoire
- le lendemain matin, traitement des *Vigna* à l'insecticide et mise en serre.

Résultat : les premières feuilles vraies de tous les *Vigna* (10) ainsi traités présentent des symptômes de mosaïque semblables à ceux obtenus par inoculation mécanique.

Contrôle : Ces feuilles présentant les symptômes sont broyées dans du tampon d'inoculation et inoculées à des *Phaseolus mungo* qui réagissent au bout de 48 heures par des lésions locales nécrotiques caractéristiques de celles causées par le virus GH1.

Conclusion : le virus GH1 est transmissible de *Vigna sinensis* black eye à *Vigna sinensis* black eye, par pucerons et suivant le mode non persistant. Il restait à savoir le pourcentage de cette transmission en déposant un seul puceron contaminé par plante.

Nous avons essayé de connaître ce pourcentage de transmission en partant de 120 *Vigna* qui ont reçu chacun un (1) puceron.

A l'apparition des premières feuilles vraies de ces plantes ainsi traitées nous n'avons pas observé des symptômes typiques comme cela a été le cas en partant de 10 pucerons. Nous avons quand même contrôlé les *Vigna* par le même procédé d'inoculation retour sur *Phaseolus mungo* et nous avons obtenu les résultats suivants : sur 20 *Vigna* contrôlés quatre (4) ont donné une réponse positive, ce qui nous donne un pourcentage de transmission de 20%.

E. Expérience de transmission par graine.

A ce sujet nous rappellerons simplement qu'un contrôle unique de *Vigna* issu de graine récoltée de plante malade a donné une réponse positive. Le temps de stage trop court ne nous a pas permis de confirmer ce résultat et éventuellement d'estimer le pourcentage de transmission par cette voie. Nous disposons actuellement de graines issues de plantes malades (confirmé par contrôle) et ce point important pour l'étude du virus GH1 pourra être éclairci.

F. Sérologie.

1. Préparation de la boîte de gélose.

Pour 100 ml d'eau il faut 0,8 d'Agarose, 0,25 g d'Azine (NaN₃). L'eau est mise à chauffer jusqu'à ébullition puis on ajoute l'Agarose très doucement sans arrêt du chauffage et sous agitation jusqu'à dissolution complète de l'Agarose. On laisse refroidir et l'on ajoute l'Azide lorsque la température tombe à 50°C, toujours sous agitation jusqu'à dissolution de l'Azide. Le milieu ainsi préparé est réparti dans des boîtes de Pétri rectangulaires plates en évitant les bulles. Après refroidissement on réalise des trous dans l'Agarose à l'aide d'un emporte pièces suivant un schéma classique : on prévoit un trou central qui recevra l'antisérum et d'autres trous équidistants de celui du centre et qui recevront les suspensions de virus que l'on veut tester contre l'antisérum.

2. Préparation des dilutions de l'antisérum.

On réalise une gamme de dilutions de l'antisérum avec du sérum physiologique (NaCl à 9‰). Dilutions 1/2, 1/4, 1/8, 1/16, 1/32, ...

3. Mise en route du test.

L'antisérum est introduit dans le trou central et les suspensions de virus dans les trous périphériques. La boîte ainsi préparée est gardée au frigidaire et examinée à temps régulier

sous lumière fluorescente. Lorsque l'antisérum est homologue à un virus donné, il apparaît un arc de précipitation fluorescent entre le trou central contenant l'antisérum et le trou périphérique contenant la suspension de virus.

Cette méthode très sensible a été utilisée pour l'étude sérologique de nombreux virus dont une trentaine de souches du virus de la mosaïque du concombre.

Concernant le GH1 nous avons effectué deux essais et qui ont donné des résultats négatifs.

- Test du GH1 contre l'antisérum Peanut stunt (souche W et souche E). Avec des jus bruts de *Nicotiana glutinosa* et *Vigna sinensis* inoculés avec du GH1 et présentant des symptômes systémiques caractéristiques.

- Test du GH1 contre l'antisérum Mosaïque du concombre souche Côte d'Ivoire dilué 1/2 avec glycérol. Avec du jus brut infectieux de *Nicotiana glutinosa* et de *Vigna sinensis*. Ces réponses négatives signifiaient que le GH1 n'est lié sérologiquement ni au Peanut stunt ni à la mosaïque du concombre souche Ivoirienne.

G. Purification.

Pour mettre une purification au point la technique employée est de suivre l'infection des jus que l'on purifie à chacune des étapes ; pour cela nous inoculons une fraction des solutions détenues à quelques *Phaseolus mungo* afin d'avoir une réponse en 48 heures.

1. Tampon de broyage : nous avons essayé 6 tampons différents et c'est le Tampon phosphate mercapto éthnaol qui nous a donné le meilleur résultat. Sa comparaison est la suivante :

Phosphate de K⁺ 0,02M,)
Mercapto-2-éthanol 0,2%) pH 7,2

2. Durée du temps de broyage : un temps de quarante cinq secondes (45 s) de broyage au "mixer waring" conservé au froid avant l'opération, donne un jus très infectieux.

3. Clarification : après avoir testé cinq méthodes différentes, celle au Chloroforme nous a donné un bon résultat avec le rapport des volumes de 1 volume de chloroforme pour 2 volumes de jus brut.

4. Conservation du pouvoir infectieux à la spermidine phosphate : ce produit est connu pour sa propriété de stabilisant de certains virus ; nous l'avons incorporé donc au tampon de broyage avec l'espoir de voir augmenter la résistance à la température ambiante du laboratoire de ce virus, qui rappelons le est de 48 heures. La concentration de spermidine utilisée est de 0,001 Molaire, mais nous n'avons pas obtenu une meilleure stabilité du virus.

Nous avons également utilisé la Formaldehyde à 0,2% dans le tampon de broyage, toujours dans le même objectif de conservation du pouvoir infectieux et les résultats ont été négatifs.

Sans doute faudrait-il poursuivre dans le même objectif et faire des essais avec plusieurs de ces produits afin de stabiliser les particules virales plus longtemps.

Malgré cette perte énorme du pouvoir infectieux, nous avons pu quand même recueillir plusieurs culots infectieux après Rotor 50 à partir de *Torenia fournieri*, *Nicotiana glutinosa* et *Vigna sinensis* black eye. Avec l'un de ces culots nous avons obtenu le spectre d'absorption suivant :

<u>Longueur d'onde</u> :	310	300	290	280	270	260	250	245	240	230
<u>Densité optique</u> :	58	126	418	850	1240	1450	1290	1160	1040	1700

$$260/280 = 1,706$$

$$M/m = 1,394$$

$$DO \text{ Total} = 290.000 \text{ soit environ } 40 \text{ mg.}$$

5. Conclusion.

En comparant la gamme d'hôtes de ce virus de la Mosaïque du haricot avec celle d'autre virus déjà décrits, il apparaît que ce virus pourrait être le virus de la Mosaïque du concombre ou du moins une de ses souches. Les propriétés biologiques déterminées nous confirment d'ailleurs ces présomptions. C'est pourquoi nous avons testé ce virus contre les antisérums du Peanut stunt virus, voisin de celui de la Mosaïque du concombre (CMV) ainsi que celui de la Mosaïque du concombre souche Côte d'Ivoire. C'est aussi la raison pour laquelle nous avons employé la méthode de purification du CMV. Les échecs rencontrés dans ces deux derniers domaines peuvent s'expliquer par l'instabilité de cette souche qui semble se dégrader très rapidement *in vitro*. Ce problèmes pourront être résolus avec l'emploi d'agents stabilisants tel que la 2 amino-propylen diamine et nous pourrons alors tester sérologiquement cette souche.

IV. ESSAIS D'IDENTIFICATION DE VIRUS FILAMENTEUX DE LEGUMINEUSES.

A. Introduction.

Dans la parcelle de collection des légumineuses du S.E.B. (Service d'Expérimentation Biologique) à Adiopodoumé, nous avons observé de nombreux symptômes sur la plupart de ces plantes et en particulier sur les espèces suivantes.

- *Clitoria rubiginosa* symptômes de mosaïque vert clair, de spottings et de panachures sur les feuilles.
- *Canavalia ensiformis* mosaïque vert foncé et légères déformations des feuilles.
- *Tephrosia erenbergiana* vein banding.
- *Desmodium gangeticum* mosaïque.
- *Crotalaria astrorulens* mosaïque.
- *Glycine javanica* étiologies plus mosaïque.
- *Cassia occidentalis* mosaïque et spottings.
- *Phaseolus* (indéterminé) spottings.

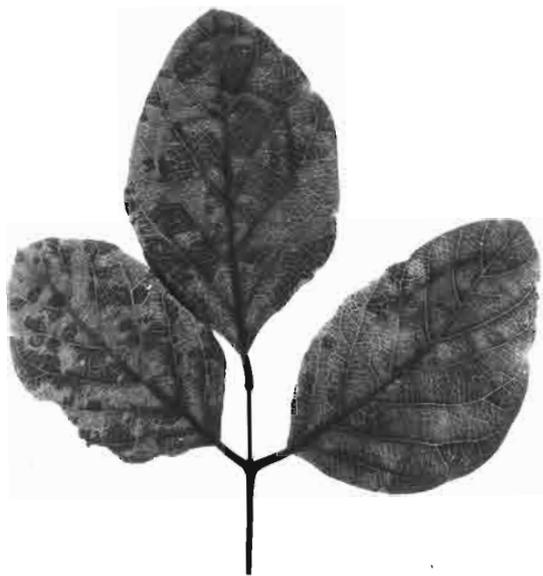
Le problème qui se pose est bien sûr, de savoir si ces symptômes sont l'expression de l'action d'un seul et même virus sur des hôtes différents ou au contraire de virus différents inféodés chacun à un hôte précis.

La résolution de ce problème, objet du travail qui vient de commencer doit aboutir à l'identification du ou des virus de collection de légumineuses. Il faut préciser que d'après des renseignements fournis par des observations au microscope électronique, la forme filamenteuse semble admise pour ces virus de légumineuses.

Nous avons limité notre travail sur les espèces *Clitoria rubiginosa*, *Canavalia ensiformis*, *Phaseolus* (indéterminé) et *Crotalaria astrorulens*.

B. Gammes d'hôtes.

(voir tableau suivant)



- Fig. 4 : Symptômes du virus de la mosaïque de *Canavalia ensiformis* inoculé sur *Canavalia ensiformis*.



- Fig. 5 : Symptômes du virus de la mosaïque de *Canavalia ensiformis* inoculé sur *Cassia occidentalis*.



- Fig. 6 : Symptômes du virus de la mosaïque de *Canavalia ensiformis* inoculé sur *Crotalaria astroculens*.



- Fig. 7 : Symptômes du virus de la mosaïque de *Canavalia ensiformis* inoculé sur *Phaseolus* indéterminé.

Plantes hôtes	Virus de <i>Canavalia ensiformis</i>	Virus de <i>Clitoria rubiginosa</i>	Virus de <i>Phaseolus</i> indéterminé	Virus de <i>Clitoria astrorulens</i>
- <i>Phaseolus</i> indéterminé	spottings	0	spottings	spttings
- <i>Phaseolus atropurpurens</i>	0	0	0	0
- <i>Crotalaria anagyroides</i>	-	0	mosaïque	0
- <i>Crotalaria astragalina</i>	-	0	mosaïque	0
- <i>Crotalaria astrorulens</i>	mottle et vein clearing	0	mosaïque	mosaïque
- <i>Crotalaria retusa</i>	-	0	spottings + vein clear.	0
- <i>Cassia occidentalis</i>	vein bauding et mottle	0	mosaïque	mosaïque
- <i>Arachis hypogaea</i>	0	0	0	-
- <i>Nicotiana glutinosa</i>	0	0	0	-
- <i>Nicotiana tabacum Xanthi</i>	0	0	0	-
- <i>Nicotiana megalosiphon</i>	0	0	0	-
- <i>Phaseolus mungo</i>	0	0	-	-
- <i>Canavalia ensiformis</i>	mosaïque + déformations	0	-	0
- <i>Vigna sinensis unguiculata</i>	0	0	-	-
- <i>Clitoria ternatea</i>	0	-	-	-
- <i>Crotalaria usaramoensis</i>	vein bauding + mottle	-	-	-
- <i>Centrosema pubescens</i>	0	0	-	-
- <i>Capsicum frutescens</i> TCA 14	0	0	0	-
- <i>Crotalaria longityrsa</i>	-	0	-	-

0 = pas de symptômes

- = non testé.

C. Essais de transmission par pucerons.

Des essais de transmission par pucerons ont été effectués pour les quatre virus dont nous avons essayé la transmission mécanique ; des pucerons *Aphis gossypii* sont placés à jeuner pendant 3 heures, alimentés sur une plante malade pendant 15 mn, puis transférés sur les plantes hôtes à raison de dix (10) pucerons par plante. Les pucerons sont tués à l'insecticide après avoir passé une nuit sur les plantes hôtes. Nous livrons ici les essais effectués et les résultats enregistrés.

1. Virus de *Canavalia ensiformis*.

- . Passage de *Canavalia ensiformis* à *Canavalia ensiformis*, résultat positif.
- . Passage de *Canavalia ensiformis* à *Phaseolus* indéterminé, résultat positif.
- . Passage de *Canavalia ensiformis* à *Arachis hypogaea*, résultat négatif.

2. Virus de *Clitoria rubiginosa*.

- | | |
|--|-------------------|
| . Passage de <i>Clitoria rubiginosa</i> à <i>Clitoria rubiginosa</i> | résultat négatif. |
| . " " à <i>Canavalia ensiformis</i> | " |
| . " " à <i>Phaseolus</i> indéterminé | " |
| . " " à <i>Arachis hypogaea</i> | " |
| . " " à <i>Crotalaria anagyroides</i> | " |
| . " " à <i>Crotalaria astragalina</i> | " |
| . " " à <i>Crotalaria astrorulens</i> | " |
| . " " à <i>Cassia occidentalis</i> | " |
| . " " à <i>Crotalaria retusa</i> | " |
| . " " à <i>Crotalaria usaramoensis</i> | " |

3. Virus de *Phaseolus* indéterminé

- | | |
|---|------------------|
| . Passage de <i>Phaseolus</i> indéterminé à <i>Canavalia ensiformis</i> | résultat négatif |
| . " " à <i>Phaseolus</i> indéterminé | " |
| . " " à <i>Arachis hypogaea</i> | " |

4. Virus de *Crotalaria astrorulens*.

- | | |
|--|------------------|
| . Passage de <i>Crotalaria astrorulens</i> à <i>Canavalia ensiformis</i> | résultat négatif |
| . " " à <i>Phaseolus</i> indéterminé | " |
| . " " à <i>Arachis hypogaea</i> | " |

D. Conclusion.

Ce travail sur les virus de la collection des légumineuses vient de commencer, le problème à savoir s'il s'agit d'un même virus ou de virus différents inféodés chacun à une légumineuse est loin d'être résolu. Nous pouvons cependant rappeler en résumé quelques résultats obtenus.

1. Le virus de *Canavalia ensiformis* est transmis mécaniquement à : *Canavalia ensiformis*, *Cassia occidentalis*, *Phaseolus* indéterminé, *Crotalaria usaramoenis*. De plus nous avons réussi la transmission par pucerons à *Canavalia ensiformis* et à *Phaseolus* indéterminé.
2. Le virus de *Phaseolus* indéterminé.
Transmission mécanique : à *Phaseolus* indéterminé, *Cassia occidentalis*, *Crotalaria anagyroides*, *Crotalaria astragalina*, *Crotalaria astrorulens*.
3. Virus de *Crotalaria astrorulens*.
Transmission mécanique à : *Crotalaria astrorulens*, *Phaseolus* indéterminé et *Cassia occidentalis*.
4. Virus de *Clitoria rubiginosa*.
Les essais de transmission mécanique et par pucerons se sont révélés négatifs.

Il est très difficile de conclure d'après ces quelques résultats. Cependant il semble que par les gammes d'hôtes on puisse déjà différencier les virus de *Canavalia*, *Crotalaria* et *Phaseolus* ; des trois, seul celui de *Canavalia* est transmis par pucerons *Aphis gossypii*. Cependant ces résultats doivent être confirmés par d'autres techniques car les légumineuses contiennent souvent des substances inhibitrices qui empêchent la transmission mécanique (ce pourrait être le cas pour le virus de *Clitoria*) ou bien la limite à la plante homologue ou bien à des plantes très voisines. Néanmoins la facile transmission du virus de *Canavalia* par *Aphis gossypii* semble démontrer qu'il soit bien différent des autres virus à moins que ces *Aphis* refusent de s'alimenter sur les autres légumineuses ? Il faudra donc effectuer d'autres expériences pour conclure à ce sujet. En ce qui concerne le virus de *Canavalia* nous pouvons, par recoupements bibliographiques, penser qu'il s'agisse du Peanut mottle virus, il faudra compléter la gamme d'hôtes et faire les propriétés biologiques pour savoir si c'est le cas.

V. BIBLIOGRAPHIE.

Dans cette partie bibliographique nous avons essayé de présenter quelques livres qui traitent de la Virologie des plantes et au travers desquels on peut trouver des méthodes de travail aussi bien pour le chercheur au laboratoire que pour le Phytovirologue qui assure la surveillance des cultures. Il s'agit bien sûr d'ouvrages disponibles au laboratoire de Virologie à Adiopodoumé.

- A. Symptoms of virus diseases in plants : par BOS L. (with indexes of names of symptoms in English, Dutch, German, French, Italian and Spanish) 2ème édition.

Dans cet ouvrage l'auteur accorde à la symptomatologie la place importante qu'elle mérite. En effet la symptomatologie qui risque d'être négligée avec l'avènement des méthodes de diagnostic modernes (sérologie, microscopie électronique), permet un diagnostic rapide des maladies virales en champs. De plus pour l'agriculteur la nature des symptômes détermine la nature et l'étendue des virus sur la récolte. On y trouve une bonne étude de la pathogenèse des virus et on fait connaissance avec les déviations chez les plantes qui ressemblent à des symptômes de maladies virales.

- B. Identification of plants viruses. Methods and experiments : par NORDAM D.

Ce livre de Virologie générale est un cours dont les exercices ont pour but de faire acquérir à l'étudiant, des méthodes qui sont en usage pour l'identification des virus ; il traite principalement des aspects phytopathologiques de la virologie des plantes. Cet ouvrage présente en ses dernières pages des planches avec des photos en couleur de certains types de symptômes.

- C. Principes and techniques in Plant-Virology : par KADO C.I. et AGRAWAL H.O.

Cet ouvrage contient vingt chapitres groupés en quatre sections (Biologie des virus des plantes - Transmission des virus des plantes - Isolement des virus des plantes - Phytobiologie et mutation). Cet arrangement a été fait suivant un point de vue expérimentaliste qui est le suivant : un virus non identifié doit être transmis à un hôte approprié, puis sa biologie est étudiée *in vitro* et *in vivo*, puis purifié et caractérisé et finalement il est utilisé comme modèle en virologie.

- D. Plant virology : par CORBETT M.C. and SISLER H.D.

Ce livre est la somme d'une série de communications et d'exercices de laboratoire présentés lors de la Session d'été en Virologie des plantes qui s'est tenue à l'Université de Maryland du 24 juin au 26 août 1963. Le but de ces cours est de familiariser les étudiants avec les données fondamentales et récentes de la Virologie des plantes. Cet ouvrage semble destiné surtout aux spécialistes.

E. Les virus des végétaux, leurs propriétés et leur identification : par SOMMEREYNS G.

(2ème édition revue et corrigée)

C'est un ouvrage en français réalisé au sein d'un laboratoire de Phytovirologie ; Il est destiné aussi bien au chercheur dans son laboratoire ou sa serre d'expérimentation qu'au praticien au cours des randonnées à travers les cultures.

F. Maladies des plantes maraîchères : par MESSIAEN C.M. et LAFON R., I.N.R.A., 2ème édition.

Par cet ouvrage, les auteurs ont voulu porter à la connaissance de tous ceux qui s'intéressent aux cultures maraîchères, les informations sur les maladies de ces cultures : maladies dues aux champignons - maladies dues aux bactéries - maladies dues aux virus - maladies dues aux nématodes.

Les données générales groupées dans les premiers chapitres permettent aux praticiens de connaître plus facilement les maladies dans leurs cultures et d'en déduire le mode de lutte auquel ils doivent avoir recours.

Le praticien phytovirologue tout en s'intéressant aux parties consacrées aux virus pourra s'informer sur les autres maladies non virales mais dont les symptômes interfèrent souvent avec des maladies virales.

VI. CONCLUSION GENERALE.

La période de six mois passée au laboratoire de Virologie a permis de nous familiariser avec certaines des méthodes et techniques de travail en virologie des plantes.

Nous avons pu apprécier par la même occasion, grâce à un travail sur un virus du haricot, toutes les difficultés que le chercheur doit résoudre à chacune des étapes multiples qui conduisent à une identification parfaite de l'agent pathogène viral d'une maladie donnée.

L'agent de Surveillance et de Protection des végétaux que nous sommes appelé à devenir pourra, grâce à cette formation, accomplir le travail de détection en champ de certaines des principales maladies virales courantes dans les zones tropicales, effectuer des essais préliminaires de sélection qui permettront d'éliminer les variétés trop sensibles.

Bien sûr l'approfondissement du travail en vue d'une identification parfaite ne pourra être réalisée que dans un Centre de recherche bien équipé où les échantillons pourront être envoyés.