

Jean DUBERN

RAPPORT DE MISSION

1 au 31 Mai 1973

Laboratoire des Virus des Plantes

Institut de Botanique

Strasbourg



OFFICE DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE ET TECHNIQUE OUTRE-MER

CENTRE D'ADIPODOUMÉ - CÔTE D'IVOIRE

B. P. 20 - ABIDJAN



Décembre 1973

RAPPORT DE MISSION

Laboratoire des Virus des Plantes
Institut de Botanique de Strasbourg

1 au 31 Mai 1973

par

Jean DUBERN

Décembre 1973

TABLE DES MATIÈRES

	pages
INTRODUCTION	1
1 - TECHNIQUES	2
1.1. <u>Fabrication des films de formvar et préparation des grilles.</u>	2
1.1.1. Généralités	2
1.1.2. Préparation des films	2
1.2. <u>Préparation pour matériel frais et suspension de virus</u>	3
1.2.1. Addition directe de matériel sur la grille	3
1.2.2. Méthode de l'éffleurement	3
1.2.3. Méthode de Kleinschmidt	4
1.3. <u>Colorations négatives</u>	4
1.3.1. Phosphotungstate de sodium	5
1.3.2. Acétate d'uranyle	5
1.3.3. Formiate d'uranyle	5
1.4. <u>Préparation pour observation in situ</u>	6
1.4.1. Fixation	6
1.4.2. Post-fixation	6
1.4.3. Deshydratation et coloration	7
1.4.4. Imprégnation et inclusion	7
1.4.5. Coloration au citrate de plomb	8
1.5. <u>Utilisation de l'ultramicrotome Reichert</u>	8
1.5.1. Préparation des couteaux de verre	8
1.5.2. Préparation de l'échantillon	9
1.5.3. Utilisation de l'ultramicrotome	9
2 - MATERIEL	11
3 - RESULTATS	12
4 - CONCLUSION	14
BIBLIOGRAPHIE	15

INTRODUCTION

La mission effectuée dans le Laboratoire des Virus des Plantes, de l'Institut de Botanique de Strasbourg, chez le Professeur L. HIRTH, s'est déroulée dans des conditions particulièrement favorables puis qu'elle nous a permis de profiter de la présence du Dr. R.G. MILNE, Professeur associé à l'Université de Strasbourg et microscopiste électronique de réputation mondiale.

Le but de cette mission a été d'apprendre des techniques classiques de microscopie électronique et de les appliquer à l'étude de notre matériel habituel, le Manioc atteint de la Mosaïque Africaine.

Des études préliminaires de matériel fixé et coloré à Abidjan n'avaient pas permis de conclure d'une façon certaine sur la nature de l'agent de cette maladie. Ces études avaient mis en évidence des filements hélicoïdaux, très semblables à ceux qui ont été notés dans les lutoïdes du latex d'Hévéa. Aucune autre particule de type viral n'avait été identifiée. Par ailleurs, quelques particules très semblables à des mycoplasmes avaient été observées dans des Piments atteints d'une maladie retransmise à partir de Manioc Mosaïqué. Cette dernière n'avait cependant reçu aucune confirmation. Nous avons donc repris ces études de microscopie électronique avec l'aide du Dr. R.G. MILNE.

1 - TECHNIQUES

1.1. Fabrication des films de formwar et préparation des grilles.

1.1.1. Généralités.

Les films employés en microscopie électronique biologique sont faits soit en cellulose (collodion, parlodion, pyroxilin, nécoloïdine), soit en formwar (polyvinyl-formaldéhyde), soit en carbone (KAY, 1965).

Les films en collodion sont faciles à préparer, ont une résistance mécanique faible et sont assez hydrophiles.

Les films en formwar sont aussi faciles à préparer, ont une résistance mécanique assez grande, mais deviennent rapidement hydrophobes.

Les films en carbone sont les plus résistants et les plus stables pour une épaisseur très faible (5-10 nm contre 20-30 nm). Ils donnent donc une meilleure résolution à fort grossissement. Cependant, leur préparation est longue et comme les autres films, ils deviennent hydrophobes en vieillissant. Pour ces diverses raisons, on utilise généralement des films en formwar ombrés au carbone, ce qui leur donne une excellente résistance mécanique et les rends plus hydrophiles.

1.1.2. Préparations des films.

Des lames de verre neuves de microscopie photonique sont utilisées. De la graisse (sébum) est déposée dessus et étalée avec un papier (Kleenex ou Kimwipes). Les lames sont ensuite essuyées avec un papier siliconé (pour lunettes). Cette méthode est indispensable, car, sans graisse, les films de formwar adhèrent très fortement au verre et s'en détachent très difficilement. Les lames sont trempées dans une solution de formwar à 0,2 % (poids/volume) dans du chloroforme (ou du 1-2 dichloréthane) ; si le trempage est rapide, les films sont épais ; s'il est lent, les films sont minces. On gratte les bords des lames et on découpe des carrés de 3 à 4 mm de côté avec les pointes d'une pince.

Les films se décollent en trempant la lame inclinée à 45° dans de l'eau distillée froide, et flottent à sa surface. Chaque petit carré de film est pêché en plaçant une grille de microscopie électronique (300 mesh) par en dessous, face mate contre le film. Les grilles sont au préalable dégraissées à l'acétone pour favoriser l'accrochage du film. Cette technique ne présente aucune difficulté. Les grilles sont déposées sur un papier filtre et portées dans un appareil à ombrer afin d'y déposer un film de carbone.

1.2. Préparation pour matériel frais et suspension de virus.

Il est parfois nécessaire de connaître l'état de fractions cellulaires sans aller jusqu'à effectuer une extraction et une purification. Trois méthodes sont habituellement utilisées pour l'observation rapide des composants cellulaires. Une quatrième, actuellement abandonnée, est celle des "exsudats de feuilles" (JOHNSON, 1961).

1.2.1. Addition directe de matériel sur la grille.

La méthode la plus simple consiste à déposer sur une grille préparée avec un film de formvar ombré au carbone, une goutte de suspension clarifiée ou d'extrait brut. L'extrait peut être simplement un broyat de limbe (4 mm²) de feuille sur une lame propre, effectué avec une baguette de verre dans une goutte d'eau ou de tampon.

1.2.2. Méthode de l'éffleurement ("Dip Préparation").

Sur une grille préparée est déposée une goutte d'eau ou de tampon. On passe la tranche fraîchement coupée d'une feuille sur la goutte d'eau. Une partie du contenu des cellules coupées va couler dans la goutte et ainsi former un film sur sa surface. La grille est ensuite lavée avec une ou deux gouttes de colorant et séchée (BRANDES, 1957 ; HITCHBORN et HILLS, 1965).

1.2.3. Méthode de Kleinschmidt ("Spreading method").

Le principe de la méthode est le suivant : quand certaines protéines sont en flottaison sur une surface d'eau propre, elles se dispersent et forment un film dénaturé de monomères. Les acides nucléiques libérés sont fixés puis stabilisés par les monomères protéiques. Le succès de la technique est dû à la docilité et à la possibilité de dispersion de la molécule filamenteuse de s'étendre dans deux dimensions souvent sans enchevêtrement. La forme, la longueur, le nombre de brins, les zones de dénaturation et autres modifications peuvent alors être observées. (KLEINSCHMIDT, 1968).

Pratiquement, une cuve de verre à fond noir est remplie d'eau distillée très propre. La surface est "essuyée" avec un papier filtre et du talc est saupoudré. Une goutte d'extrait brut de plante, fraîchement préparé, est déposée à l'aide d'une baguette de verre à la surface du bac. Le talc permet alors de visualiser l'extension de la goutte à la surface de l'eau. Une grille préparée avec film de formvar ombrée au carbone est plongée dans l'eau à la périphérie du bac et est remontée doucement dans la zone d'extension de l'extrait. Elle est séchée puis colorée négativement.

Diverses adaptations permettent de favoriser l'écoulement et la stabilisation de certains composants cellulaires (MURA et al., 1967 ; LANG et al., 1967).

1.3. Colorations négatives.

Le principe de la coloration est simple. Il s'agit de déposer quelques gouttes de solution de colorant sur une grille ayant déjà recueilli une suspension de matériel à observer. Le colorant est laissé 1 à 2 minutes puis la préparation est lavée avec de l'eau distillée ou du tampon et séchée sur un papier filtre. (HORNE, 1965).

Les principaux colorants habituellement utilisés sont le phosphotungstate, l'acétate et le formiate d'uranyle.

1.3.1. Phosphotungstate de sodium.

Le phosphotungstate de sodium ou de potassium est utilisé à 1 ou 2 % en solution aqueuse. Il est stable à la lumière et à la température ambiante. Il peut être tamponné à un pH variable avec de l'acétate d'ammonium ou plus généralement avec du carbonate d'ammonium à la molarité de 0,1. Il a l'inconvénient de détruire certains organites, notamment les ribosomes ; ceci peut cependant être évité par l'addition de formol, (GIBBS et al., 1963). Il permet par contre une meilleure visualisation des particules virales. Il a l'inconvénient de donner de nombreux artefacts (WOLANSKI et MARAMOROSCH, 1970).

1.3.2. Acétate d'uranyle.

L'acétate d'uranyle est utilisé soit à 1 %, soit à saturation (environ 2 %) dans l'eau. Il se conserve bien à l'abri de la lumière. Il donne une résolution meilleure que le phosphotungstate de sodium, mais l'étalement du colorant est moins uniforme. Non tamponné, il est fortement acide (pH 4,2). A un pH supérieur à 5,5, il précipite. Il peut cependant être complexé avec de l'E.D.T.A. et être stabilisé aux pH alcalins voisins de la neutralité (BRUGGEN et al., 1962). La solution à 1 % d'acétate d'uranyle est mélangée à un même volume de dihydrate de E.D.T.A. dissodique à 0,5 % et d'acétate d'ammonium à 0,1 %. Le pH est ajusté à volonté avec NH_4OH ou HCH_3COO . Le colorant est filtré sur filtre Millipore avant utilisation.

1.3.3. Formiate d'uranyle.

Le formiate d'uranyle est instable à la lumière et sa solution aqueuse encore plus. Il est préparé très souvent ex-temporément. UO_3 est dissous en excès dans de l'acide formique dilué. La solution est filtrée puis évaporée jusqu'à ce que la cristallisation apparaisse. La solution est refroidie et les cristaux sont recueillis par filtration puis lavés avec de l'éthanol froid et séchés sur papier filtre. Le solide obtenu se conserve à l'obscurité et à la température ambiante (LEBERMAN, 1965). Ce colorant permet une meilleure résolution avec les virus à symétrie hélicoïdale (VARMA et al., 1968).

1.4. Préparation pour observation in situ.

1.4.1. Fixation.

La technique utilisée est déjà décrite par MILNE (1972). Le fixateur le plus généralement utilisé est le glutaraldéhyde. Trois solutions mères sont préparées et conservées à 4° C : glutaraldéhyde à 5 % en eau, $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12 \text{H}_2\text{O}$ 0,2M (71,63 g/l) et KH_2PO_4 0,2M (27,22 g/l). La solution fixatrice est du glutaraldéhyde 2,5 % en tampon phosphate 0,1M à pH 6,8. La fixation est effectuée à 20-25° C à la lumière.

Des échantillons de 2 X 1 cm sont découpés dans le limbe des feuilles, dans une goutte ^{de} fixateur tamponné, sur une lame de verre, puis sont immergés dans le fixateur. Afin de favoriser la pénétration du fixateur et de vider les méats aériens, les tubes contenant les échantillons immergés sont mis en relation avec une pompe à vide (0,8 kg/cm²). La mise sous vide est effectuée très lentement. Au bout de 1 heure, le vide est cassé lentement (passage de l'air par un tube capillaire). S'il y a lieu, le cycle est recommencé. La durée de la fixation est variable suivant les échantillons traités. Il faut compter au moins une heure à partir de l'instant où l'échantillon est descendu au fond du tube. La pénétration du fixateur donne un aspect huileux à l'échantillon et permet ainsi de suivre sa progression.

L'échantillon est ensuite lavé dans le tampon phosphate 0,1 M à pH 6,8, une seule fois. Ce lavage n'est pas indispensable. Il permet cependant de travailler et de retailler les échantillons sans se fixer les doigts. Les bords de l'échantillon sont jetés et des fragments de 2 x 4 mm sont coupés.

1.4.2. Post-fixation.

Une deuxième fixation est nécessaire. Elle est effectuée très généralement avec une solution de tétr oxyde d'osmium à 1 % en tampon phosphate 0,1M à pH 6,8. Des solutions mères sont préparées à cette fin : solution de tétr oxyde d'osmium à 2 % dans l'eau et solution de phosphate 0,2M à pH 6,8. Ces solutions sont conservées à l'abri de la lumière (en boîte noire étanche) à 4°C.

La postfixation est effectuée dans une hôte (OsO₄ est très dangereux car très volatil et très facilement absorbé par les muqueuses). Elle dure de 1 à 2 heures à température ambiante et à la lumière.

1.4.3. Déshydratation et coloration.

4 lavages de 5 mn chacun sont successivement effectués avec un mélange eau-acétone (V/V). Puis une première coloration est faite avec de l'acétate d'uranyle, pendant une heure à température ambiante ou nuit à 4°C, dans l'obscurité totale. La solution de colorant contient 70 % d'acétone, 30 % d'eau et de l'acétate d'uranyle à saturation (effectuée en additionnant des cristaux).

La déshydratation est ensuite poursuivie dans deux bains d'acétone à environ 100 % pendant 15 mn chaque fois. Puis elle est achevée par le passage dans des bains d'acétone totalement pur.

1.4.4. Imprégnation et inclusion.

L'imprégnation et l'inclusion sont habituellement faites avec de la résine Epon dont la préparation peut être réalisée à l'avance. Cette résine est conservée plusieurs semaines à -60° C. Elle est obtenue de la façon suivante, en malaxant à chaque fois le dernier produit additionné avant d'ajouter le suivant :

M N A (Méthyl Nadic Anhydride)	35,6 ml
D.D S A (Dodecenyyl Succinic Anhydride)	60,0 ml
Epon 812	77,2 ml
D M P 30 (tri(diméthylaminométhyl)-phénol)	2,7 ml

En variant les proportions de ces divers éléments, il est possible d'augmenter la fluidité ou la vitesse de polymérisation de cette résine.

L'imprégnation est réalisée en plongeant les échantillons successivement dans un mélange résine-acétone 50 % - 50 %, puis dans deux bains de résine pure. Cette opération est effectuée avec chauffage très doux par une lampe infra-rouge à 40°C et agitation lente pendant 1 heure dans chaque bain.

L'inclusion est réalisée soit dans des gélules en polyéthylène ou en gélose (dissoute par la suite par l'eau chaude acidulée), pour les échantillons ne nécessitant pas une orientation précise, soit dans des alvéoles de plaques en caoutchouc dans lesquelles les échantillons peuvent être placés très exactement.

1.4.5. Coloration au citrate de plomb.

Le colorant est réalisé en additionnant successivement :

$\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$ 1,3 g

$\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 1,75 g

H_2O distillée et bouillie (sans CO_2) 30 cm^3 .

On obtient une solution laiteuse qui devient claire par addition de 8,0 cm^3 de NaOH N. Le pH final est alors voisin de 12. Si la solution ne devient pas claire, il faut tout recommencer ; elle contient alors du carbonate. Il faut éviter lors de la préparation un contact trop prolongé avec l'air et utiliser une fiole jaugée à long col, bien fermée. Il faut aussi pipeter sans envoyer de l'air.

La coloration est effectuée dans une boîte de Pétri, comme pour un repiquage avec un milieu stérile, sans souffler et en ouvrant très peu de temps. Elle est réalisée sur les coupes ultra-fines déjà disposées sur les grilles de microscopie électronique. Un papier filtre imbibé de soude est placé dans le fond du couvercle de la boîte de Pétri. Des pastilles de soude sont déposées dans la boîte autour d'une capsule contenant le colorant. Toutes ces précautions sont indispensables pour éviter la carbonatation du colorant dans la capsule. Les grilles sont plongées pendant 30 secondes dans le colorant, l'une après l'autre, puis rincées dans l'eau, dans trois bains différents, chaque fois renouvelés, et enfin sont séchées sur du papier filtre (REYNOLDS, 1965).

1.5. Utilisation de l'ultramicrotome Reichert.

1.5.1. Préparation des couteaux de verre.

Des baguettes de verre épaisses, spéciales pour microscopie électronique, sont débitées en carrés, à l'aide d'un diamant

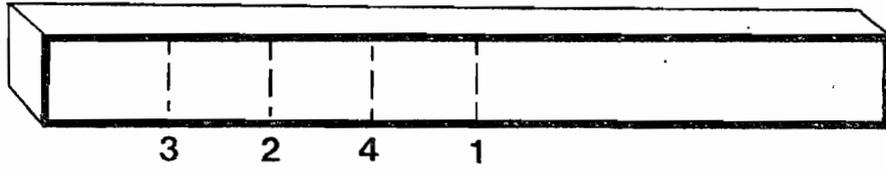


Fig. 1 : Ordre des cassures

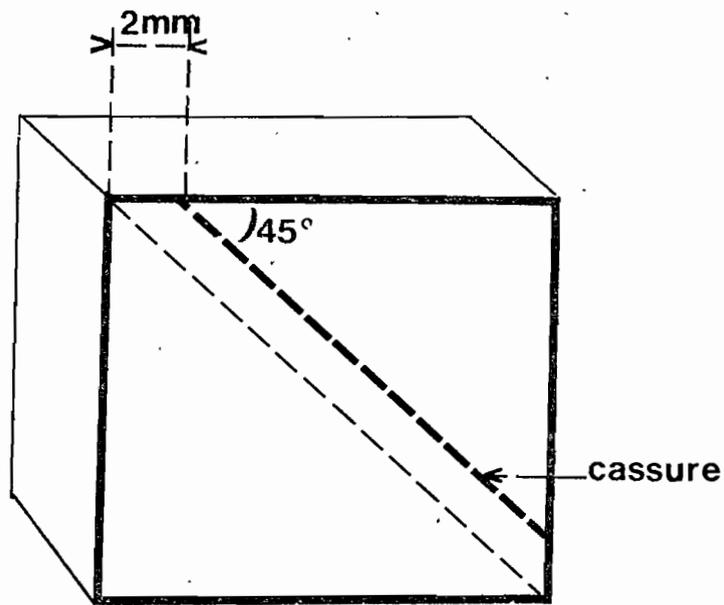


Fig. 2 : Position de la dernière cassure

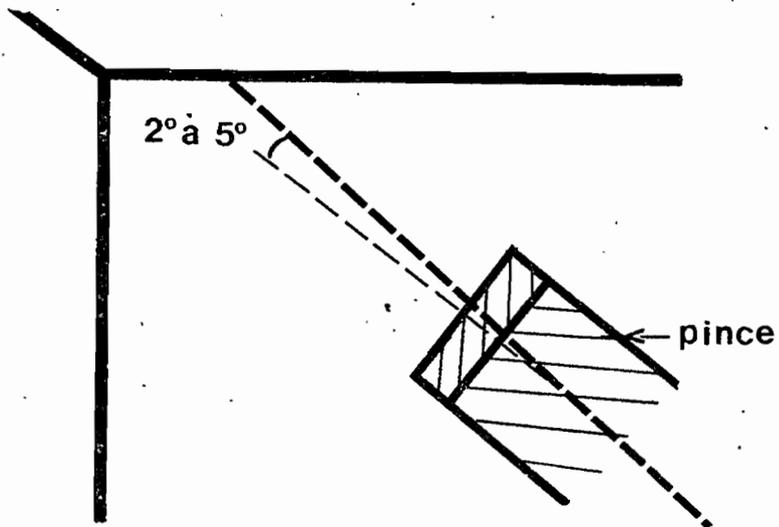


Fig. 3 : Positon de la pince

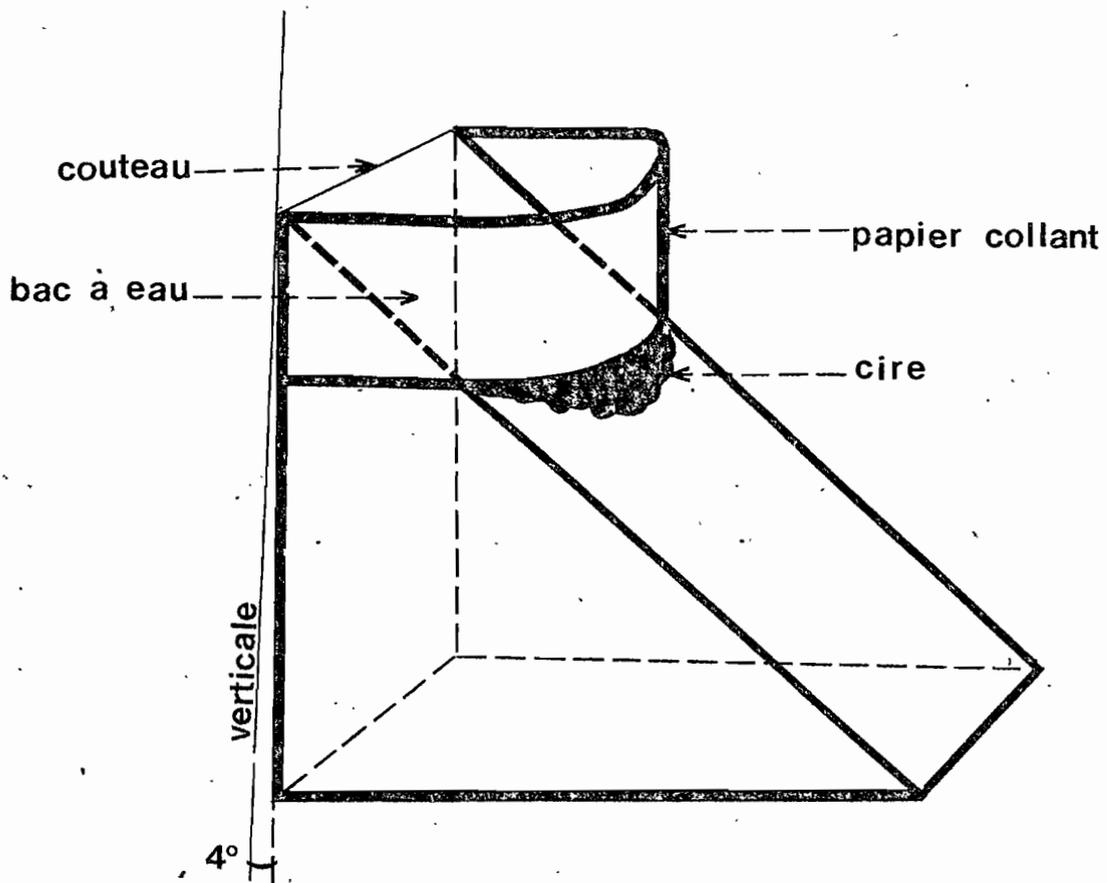


Fig. 4 : Confection du bac à eau

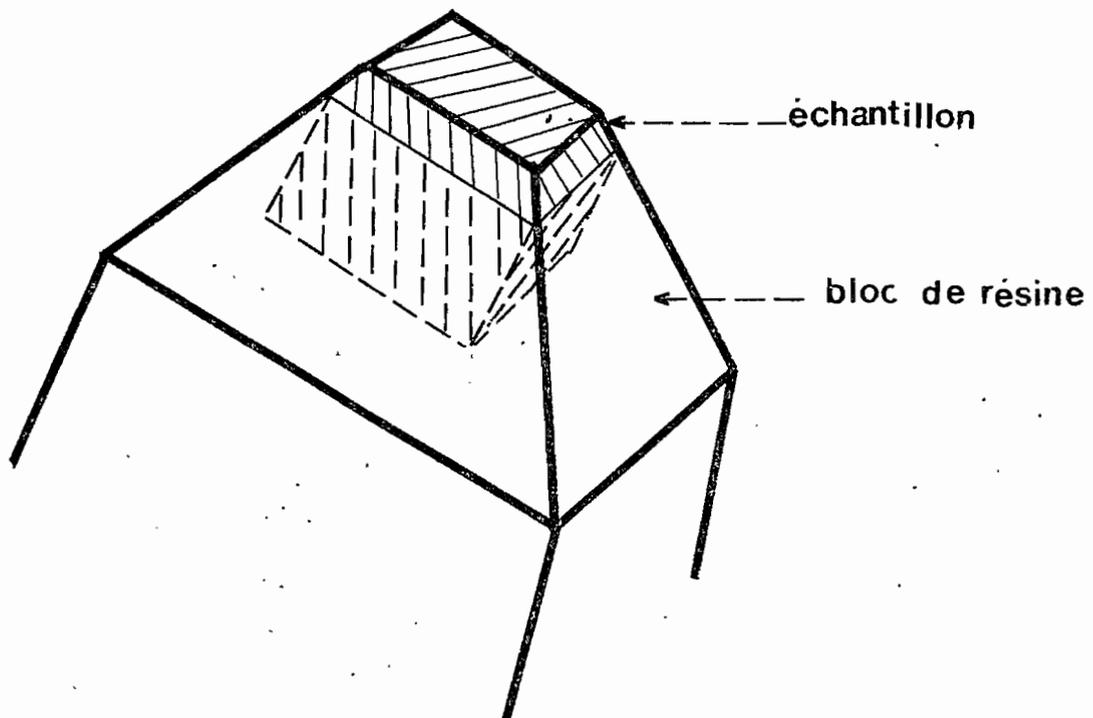


Fig. 5 : Préparation d'un bloc de résine

de verrier et d'une pince spéciale (Fig. 1). Puis sur chaque carré est tracé au diamant un trait parallèle à une diagonale (Fig. 2). A l'aide de la pince spéciale, le carré de verre est cassé (Fig. 3).

Une fois le couteau obtenu, il faut lui adapter un petit bac à eau afin de recueillir les coupes. Ce bac est confectionné avec un papier collant (Scotch) brillant et l'étanchéité est assurée avec de la cire à cacheter (Fig. 4).

1.5.2. Préparation de l'échantillon.

Le bloc de résine contenant l'échantillon est placé dans le porte-objet avec une cale en bois. Le porte-objet est lui-même fixé dans le portoir horizontal de l'ultramicrotome. L'échantillon est alors dépauillé de la résine superflue, puis taillé en pyramide tronquée avec une lame de rasoir (Fig. 5), de telle sorte que la surface de la coupe soit de 0,5 à 1 mm². Puis le porte-objet est oté du portoir et fixé dans le portoir vertical pour être coupé.

1.5.3. Utilisation de l'ultramicrotome.

Le couteau est alors fixé dans le portoir horizontal. En principe, un couteau en verre ne peut être nettoyé sans en altérer le fil ; un couteau en diamant peut être nettoyé avec un morceau de balsa imbibé d'eau ou de s'alive. Le couteau est incliné à 4° (Fig. 4). Les positions du couteau et du porte-objet sont réglées doucement. Deux gouttes d'eau sont déposées dans le bac à eau du couteau ; le niveau peut être maintenu constant grâce à un capillaire relié à un réservoir. Un spot lumineux est orienté sur le couteau. La couronne dentée du bouton d'entraînement manuel est réglée de telle sorte que la plus faible vitesse de déplacement de l'objet ait lieu au moment de la coupe. La vitesse de déplacement du couteau est aussi réglée.

L'obtention de coupes semi-fines ne pose pas de problème. L'épaisseur des coupes est déterminée par leur couleur interférentielle : inférieure à 50 nm elles sont grises ; de 50 à 80 nm elles sont argentées et supérieure à 150 nm dorées. Les coupes

semi-fines sont observées soit au microscope photonique à contraste de phase, soit au microscope photonique normal après coloration par le bleu de toluidine. Une goutte d'eau est déposée sur une lame de verre avec une coupe semi-fine. La lame est chauffée doucement au dessus d'une veilleuse de bec Bunsen ; la coupe s'étale et se colle au verre. Deux gouttes de bleu de toluidine sont déposées sur la lame qui est à nouveau chaffée très légèrement. La lame est rincée à l'eau et la coupe est montée dans l'eau sous une lamelle. L'observation permet d'apprécier la qualité de la fixation et de l'imprégnation, puis de localiser dans l'échantillon les parties à débiter en coupes ultrafines.

Les coupes ultrafines sont effectuées en mettant en marche l'avance automatique du porte-objet (dilatation du support par chauffage) et le déplacement automatique du couteau. Les coupes sont péchées dans le bac à eau directement avec les grilles.

2 - MATERIEL

Les études ont été effectuées sur les plantes suivantes :

- des Maniocs (*Manihot utilissima*) sains de semis ;
- des Maniocs de semis atteints de la Mosaïque Africaine, retransmise par *Bemisia tabaci* Genn. (Aleyrodidae) à partir de Maniocs malades prélevés dans les collections du Centre ORSTOM d'Adiopodoumé,
- des Piments (*Capsicum frutescens*) sains de semis,
- des Piments de semis, atteints d'une maladie (leaf narrowing et vein greening) transmise par *Aleyrodes* à partir de Maniocs mosaïqués,
- des Ancolies (*Aquilegia vulgaris* L.) virescentes, provenant du jardin de l'Institut de Botanique de Strasbourg.

Les plants de Piments et de Maniocs, de 30 à 40 cm de hauteur avaient été apportés par avion depuis la Côte d'Ivoire et replantés dans la serre tropicale de Strasbourg.

Les études ont été faites sur diverses parties de ces plantes, limbes, pétioles et nervures de jeunes et de vieilles feuilles pour les Maniocs et Piments, et en plus pétales, étamines et pédoncules floraux virescents pour les Ancolies.

3 - RESULTATS.

Nous avons cherché en premier des organismes de type mycoplasme dans les plantes malades par la technique des inclusions, afin de confirmer la première observation effectuée en 1972 sur le Piment. Nous avons cherché ces agents dans les Maniocs et Piments malades. Pour contrôler notre technique, aussi bien d'ailleurs pour nous initier à l'observation de particules de type mycoplasme, nous avons étudié des Ancolies virescentes, dans lesquelles ont déjà été observés des mycoplasmes (WESPHAL, 1972). Cinq inclusions et observations ont été effectuées sur le Piment sain, huit sur le Piment malade, huit sur le Manioc sain dix sept sur le Manioc malade et quatre sur l'Ancolie virescente. Seulement dans l'Ancolie nous avons pu observer des particules de type mycoplasme, en très grande quantité dans les vaisceaux libériens. (Fig. 6).

Les fixations et les inclusions étaient correctes pour les étamines et les pédoncules floraux mais non pour les tiges des Ancolies. Nous avons eu quelques difficultés avec les tiges de Manioc et de Piment âgés et surtout pour le limbe des feuilles de Manioc, pour lesquels nous avons dû prolonger les temps de fixation par le glutaraldéhyde. Cependant, même dans le cas d'une mauvaise fixation, nous avons pu observer des particules de type mycoplasme, dans les tiges d'Ancolie virescente.

Nous n'avons pu observer ces organismes, ni dans le Manioc ni dans le Piment malades. Dans le cas du Piment, nous n'étions pas certains de trouver des particules. En effet, après la transplantation de Côte d'Ivoire à la France, ces plants avaient perdu leurs feuilles, puis la végétation avait repris ; les nouvelles feuilles semblaient saines et une rémission de la maladie s'était établie. Dans le cas des maladies à mycoplasmes les rémissions sont fréquentes ; pendant ces périodes, la détection des particules mycoplasmales est alors difficile. Rien ne peut donc être affirmé dans le cas des Piments. Le Manioc avait par contre très bien subi la transplantation et les plants malades avaient repris et formé de nouvelles feuilles mosaïquées.

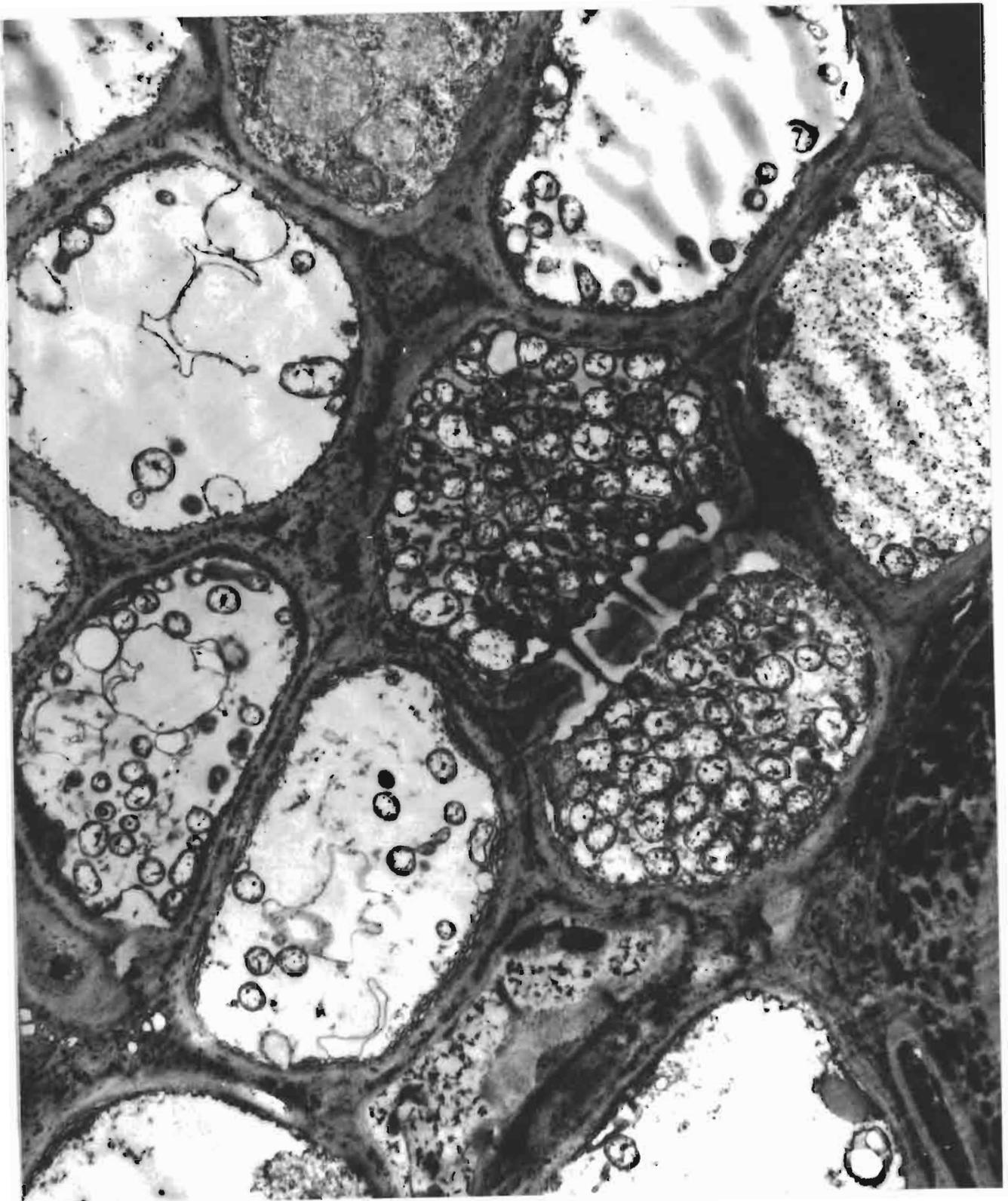


Fig. 6 : Cellules de liber d'Ancolie, contenant des particules de type mycoplasme (X 5000).

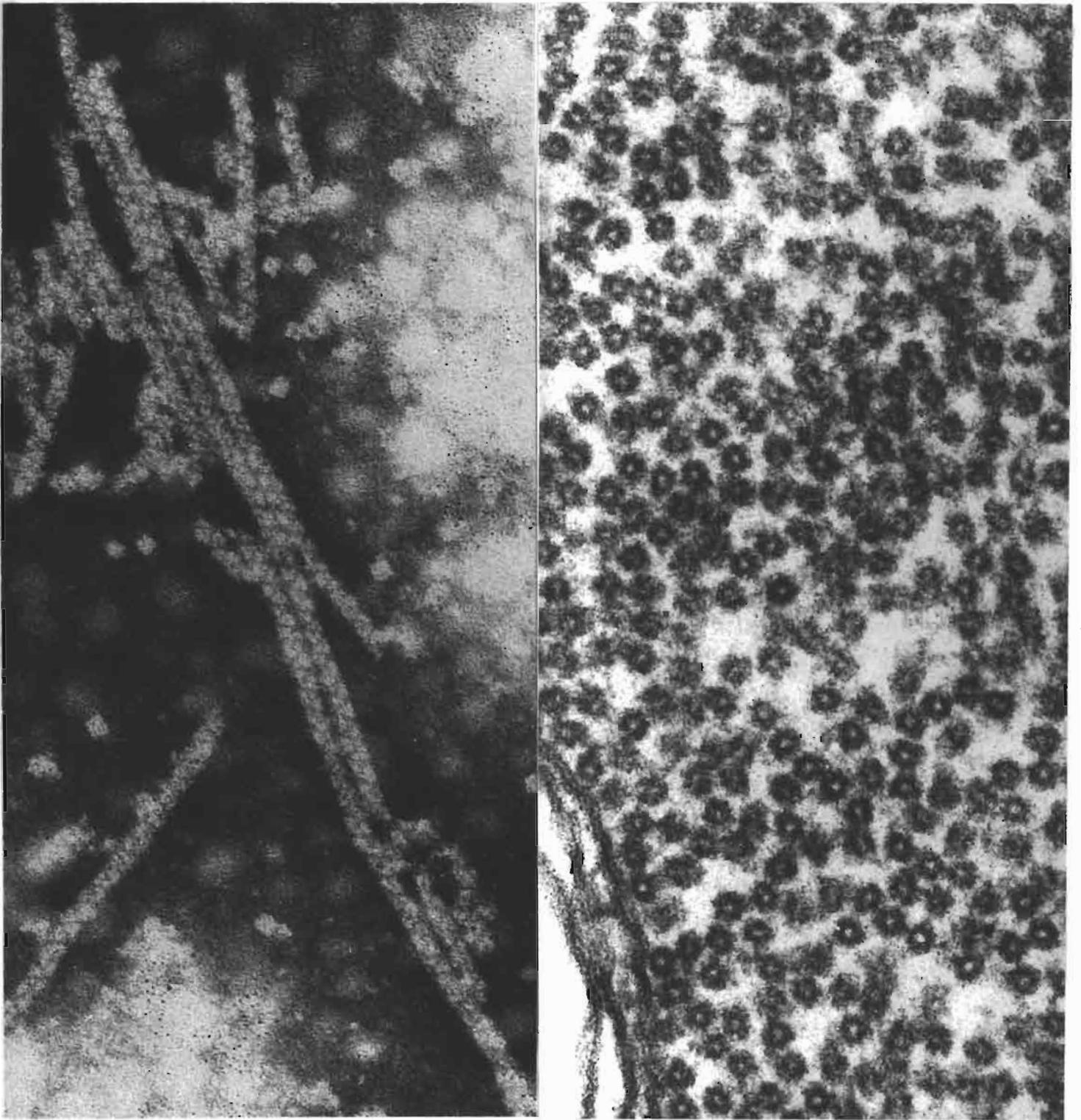


Fig. 7 et 8. Particules filamenteuses présentes dans les Laniocs sains et mosaïqués. (7): filaments vus dans un extrait brut; (8): coupes transversales de ces filaments dans un morceau de limbe inclus dans de la résine. (X 400 000)

Cependant, les plants de Manioc étaient de jeunes plants ne montrant que des symptômes de mosaïque mais non de rabougrissement ou de balai-de-sorcières. L'absence de structure de type mycoplasme dans les plants mosaïqués tendrait à montrer que la mosaïque africaine n'est pas liée à la présence d'un mycoplasme ; une situation négative ne constitue cependant pas une preuve, mais une présomption. L'observation effectuée en 1972, de particules de type mycoplasme, pourrait donc être liée non pas à la Mosaïque Africaine mais à une autre maladie, présente en même temps dans la plante, de type rabougrissement ou balai-de-sorcières.

L'hypothèse virale n'ayant pas été écartée, dans notre étude, nous avons aussi effectué des essais rapides de mise en évidence de matériel viral selon les techniques décrites au paragraphe 1.2. Que ce soit par ces techniques rapides ou par la technique des inclusions, aucune particule typiquement virale n'a été observée, ni dans les Maniocs ni dans les Piments sains et malades. Seules des particules filamenteuses présentant un enroulement hélicoïdal très net et un diamètre voisin de 15,5 nm, ont été observées aussi bien dans les Maniocs malades (Fig. 7 et 8) que dans les Maniocs sains. Ces particules avaient déjà été observées avec l'aide des Dr. PFEIFFER et WURTZ (Laboratoire des Virus des Plantes de l'Institut de Botanique de Strasbourg). Une étude systématique portant sur plusieurs centaines de plants sains et malades de Manioc avait démontré leur présence en grande quantité. Des particules très semblables ont déjà été photographiées chez l'Hévéa (*Hevea brasiliensis*), plante de la même famille que le Manioc (DICKENSON, 1969). Ces particules de nature protéique, proviennent des lutoïdes du latex.

4 - CONCLUSION.

L'étude réalisée à Strasbourg nous a permis d'apprendre des techniques de microscopie que nous pourrions utiliser à Abidjan. Peu de résultats ont cependant été acquis par suite de l'éloignement entre l'implantation des lieux de production et du laboratoire de microscopie. Cette étude demanderait à être complétée par une autre sur les Piments montrant des symptômes de rabougrissement ou de balai-de-sorcières nouvellement formés, ainsi que par celle de Maniocs montrant un rabougrissement très prononcé et pas seulement une mosaïque. Ces études devraient être effectuées en grand nombre pour être très affirmatif sur l'absence de lien entre la Mosaïque et les structures de type mycoplasme d'une part, et sur l'existence d'un lien entre les balais-de-sorcières et les rabougrissements et ces structures. Ces études sont difficilement concevables en l'absence d'un microscope électronique en Côte d'Ivoire, car le transport des plantes en Europe altère par trop leur métabolisme et donc les résultats expérimentaux. L'existence d'un ultramicrotome permettrait déjà d'effectuer et de contrôler sur place la fixation et l'inclusion des échantillons, et constituerait un grand progrès par rapport à la situation actuelle.

L'absence de particules virales dans les observations effectuées ne permet pas non plus de conclure d'une façon catégorique et d'écarter la présence d'un virus. Cependant, il nous apparait normal d'envisager actuellement une autre hypothèse en ce qui concerne l'agent responsable de la Mosaïque du Manioc, celle d'un viroïde.

Remerciements.

Cette étude a été réalisée grâce à la coopération du Dr. R.G. MILNE. Nous le remercions vivement de nous avoir dévoilé de nombreux détails d'expérimentation ne figurant habituellement pas dans les publications. Nous remercions également Monsieur le Professeur L. HIRTH de nous avoir permis d'effectuer cette mission dans son laboratoire.

BIBLIOGRAPHIE

- BRANDES, J.-Nachrbl. dent. Pflanzenschutzdienst (Braunschweig), 9, 151-152, 1957. Eine electronenmikroskopische Schnellmethode zum Nachweiss faden- und stabchenformiger Viren, insbesondere in Kartoffeldunkelkeimen.
- BRUGGEN, Van E.F.J., WIEBENGA, E.H. and GRUBER, M. - J. Mol. Biol., 4, 1-7, 1962. Structure and properties of hemocyanins. I Electron micrographs of hemocyanin and apohemocyanin from *Helix pomatia* at different pH values.
- DICKENSON, P.B. - J. Rubb. Res. Inst. Malaya, 21 (4), 543-559, 1969. Electron Microscopical studies of latex vessel system of *Hevea brasiliensis*.
- GIBBS, A.J., NIXON, H.L. and WOODS, R.D. - Virology, 19, 441-449, 1963. Properties of purified preparation of lucerne mosaic virus.
- HITCHBORN, J.H. and HILLS, G.J. - Virology, 27, 528-540, 1965. The use of negative staining in the electron microscopic examination of plant viruses in crude extracts.
- HORNE, R.W. - Methods in Virology, vol. III, Maramorosch K. and Koprowski H. ed., Academic Press New York 1967. Electron microscopy of isolated virus particles and their components.
- KAY, D.H. - Techniques for electron microscopy. Second Edition. Blackwell Scientific Publications, Oxford, 1965.
- KLEINSCHMIDT, A.K. - Methods in Enzymology, 12-b, 361-377, 1968. Monolayer techniques in electron microscopy of nucleic acid molecules.

- LANG, D., BAJARD, H., WOLFF, B. and RUSSEL, D. - J. Mol. Biol., 23, 163-181, 1967. Electron microscopy of size and shape of viral DNA in solution of different ionic strengths.
- LEBERMAN, R. - J. Mol. Biol., 13, 606, 1965. Use of uranyl formiate as a negative stain.
- MILNE, R.G. - Principles and Techniques in Plant Pathology. Ed. by C.I. Kado and H.O. Agrawal. Van Nostrand Reinhold Company London. 1972. Part 1, Ch. 4. Electron microscopy of viruses.
- REYNOLDS, E.S. - J. Cell. Biol., 17, 208-212, 1963. The use of lead citrate at high pH as an electron-opaque stain in electron microscopy.
- WESTPAHAL, E. - 97e Congrès des Sociétés Savantes, Nantes 1972. Etudes de quelques cas de virescences à mycoplasmes.
- WOLANSKI, B. and MARAMOROSCH, K. - Virology 42, 319-327, 1970. Negatively stained mycoplasmas : fact or artifact ?