

Influence du pH sur le virus de la mosaïque de la canne à sucre,

par P. BAUDIN (*). Pierre (Phylo) de J. K. 87-

La souche virale qui provoque une mosaïque sur canne à sucre et maïs, sur les hauts plateaux de Madagascar, a de nombreux caractères communs avec les souches de virus de la Mosaïque de la canne à sucre (V.M.C.S.), souches A (1) et H (2), et avec le Maize Dwarf Mosaic Virus (M.D.M.V.) (3). Le virus est une longue particule de 7 500 Å (4). La constante de sédimentation en tampon borate 0,01 M pH = 8,6, est de 151 S, proche des valeurs trouvées par Bancroft (1), 158 S, pour V.M.C.S.-A et Sehgal (3), 148 ± 2 S, pour le M.D.M.V. Les méthodes de purification utilisées pour le V.M.C.S.-A (1), V.M.C.S.-H (2) et M.D.M.V. (3) ne permettent pas d'obtenir des préparations convenables avec la souche malgache. L'étude du comportement de la souche virale des hauts plateaux malgaches en fonction du pH a permis, d'une part, de déterminer le pH iso-électrique de la protéine virale et, d'autre part, de mettre en évidence quelques particularités de cette souche par rapport aux observations faites sur V.M.C.S.-A, V.M.C.S.-H et M.D.M.V.

(* Avec la collaboration technique de E. Rajaonarivelo et l'aide matérielle de l'Institut Pasteur de Madagascar.

(1) J. B. Bancroft, A. J. Ullstrup, Mimi Messieha, C. E. B. Bracker et T. E. Snazelle, *Phytopathology*, 1966, t. 56, p. 371.

(2) T. P. Pirone et L. Anzalone, *Phytopathology*, 1966, t. 56, p. 371.

(3) O. P. Sehgal, *Phytopath. Z.*, 1968, t. 62, p. 232.

16 JUIN 1972

O. R. S. T. O. M.

Collection de Références

n° 550 1 de Phylo

Matériel et Méthodes. — Les suspensions virales sont préparées par broyage des premières feuilles déroulées de canne à sucre, variété Lousier, en présence de tampon Tris-EDTA 0,05 M, pH = 7, additionné de mercaptoéthanol à 0,1 %. L'extrait est clarifié au chloroforme dans la proportion de 1 vol. pour 4 vol. Puis, il est centrifugé 3 h à $40\,000 \times g$. Les culots sont repris dans du tampon Tris-EDTA 0,005 M. Le virus est alors exclu d'une colonne d'Agarose BIO-RAD 15 M par du tampon Tris-EDTA 0,005 M, pH = 7. Les suspensions virales sont centrifugées 50 mn à $105\,000 \times g$ et les culots sont repris, soit dans du tampon Tris-EDTA 0,005 M, pH = 7, soit dans du tampon phosphate 0,01 M, pH = 7,2, soit dans du tampon borate 0,01 M, pH = 8,6, ou dans l'eau distillée. Les détails de la méthode de purification ont été donnés par ailleurs (4).

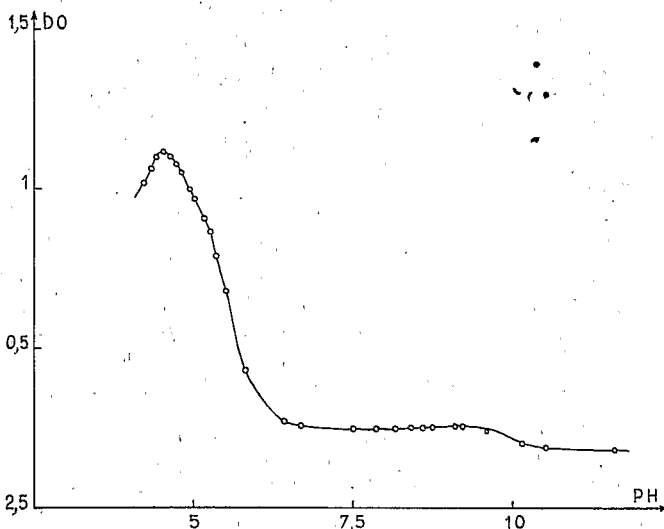


Fig. 1. — Influence du pH sur le virus de la mosaïque de la canne à sucre.

Le virus est dosé par spectrophotométrie. Le coefficient d'extinction à 260 nm a été déterminé par pesée d'une suspension virale de 22,4 mg après séchage à poids constant sur une balance Mettler au 1/10 de mg près. Le coefficient d'extinction est de 1 pour $0,42 \pm 0,02$ mg/ml, 1 cm.

Les propriétés infectieuses des suspensions virales sont évaluées par inoculation à des maïs, population locale, âgés de 8 jours, par frottement de deux feuilles déroulées, préalablement saupoudrées de carborundum. On observe une réaction systémique sur les feuilles du cœur au bout de 8 à 10 jours.

L'action du pH a été étudiée par une technique voisine de celles utilisées par Oster (5), Tremaine (6) ou Wurtz (7). Une suspension de

(4) P. Baudin, *Terre Malgache*, 1970, t. 3, p. 197.

(5) G. Oster, *J. Biol. Chem.*, 1951, t. 190, p. 55.

(6) J. H. Tremaine, *Virology*, 1970, t. 42, p. 611.

(7) M. Wurtz, Thèse Fac. des Sc., Strasbourg, 1969, p. 18.

virus dans l'eau distillée, de 8 à 10 mg dans 5 ml, donne un pH compris entre 6,5 et 7,2, selon les expériences. Les divers pH sont obtenus par addition de gouttes à la pipette Pasteur de HCl ou de NaOH 0,01 N. Ils sont lus au 1/10 près, au pH mètre Tacussel avec une électrode double concentrique pouvant plonger dans un tube. L'agrégation du virus est appréciée par turbidimétrie à la longueur d'onde 460 nm au spectrophotomètre Jobin Yvon Stand M V.

Résultats. — Le virus s'agrège vers les pH acides. On observe une précipitation à l'œil au pH 5,5, puis la suspension s'épaissit. La D.O. augmente jusqu'au pH 4,5, puis diminue (fig. 1). Le point isoélectrique du V.M.C.S. se trouve donc autour de 4,5.

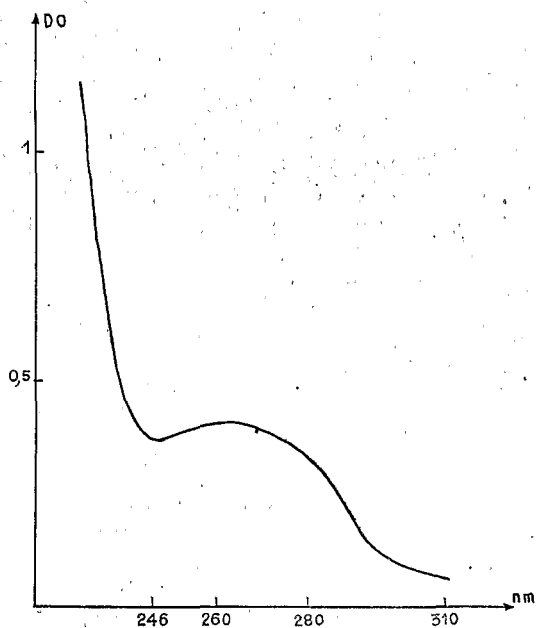


Fig. 2. — Spectre du V.M.C.S. après précipitation acide.
Tampon borate pH = 8,6.

Vers les pH basiques, la D.O. se maintient jusqu'au pH 10, puis diminue légèrement.

Au pH 4,5, point isoélectrique, le virus peut être sédimenté en tube conique par centrifugation à basse vitesse (10 mn à $6\,000 \times g$). Le culot est redissous dans du tampon borate 0,01 M, pH = 8,6. Le spectre de la suspension obtenue est caractéristique du virus (fig. 2). Le rapport 260/280 est de 1,23 ; il correspond aux meilleures préparations de virus obtenues. La suspension virale avant préparation acide avait un rapport de 1,16. Le surnageant présente un spectre de nucléoprotéine de rapport 1,12, et doit correspondre à du virus dégradé.

Le pouvoir infectieux est conservé. Des extraits virosés dans le tampon borate 0,01 M, pH = 8,6, sont encore infectieux à une dilution de $0,25 \times 10^{-3}$ mg/ml. Cette limite de dilution est du même ordre que celle de préparations virales en suspension dans un tampon phosphate 0,05 M, pH = 7,2 (tableau).

Quantité de virus par ml	Phosphate 0,01 M pH 7,2	Borate 0,01 M pH 8,6 après précipitation acide
1×10^{-1} mg	18/18	—
1×10^{-2} mg	16/19	8/10 (*)
1×10^{-3} mg	8/20	7/10
$0,5 \times 10^{-3}$ mg	8/20	2/9
1×10^{-4} mg	0/20	0/10

(*) Nombre de maïs contaminés sur le nombre de maïs inoculés.

Pouvoir infectieux du V.M.C.S. en fonction de la dilution dans deux tampons à pH = 7,2 et pH = 8,6.

La précipitation acide d'une suspension virale dans l'eau distillée peut permettre une reconcentration du virus au cours d'une purification. Une suspension de 19,8 mg de virus dans le tampon Tris-EDTA 0,005 M, pH = 7 a été dialysée contre de l'eau distillée. Le pH a été ajusté à 4,5. Le virus a été sédimenté par centrifugation de 5 mn à $8\,000 \times g$ en tube conique. Le culot est repris dans le tampon borate 0,01 M, pH = 8,6. Par spectrophotométrie, on peut doser 12,0 mg de virus. Ce rendement (0,6) est comparable à celui d'une ultracentrifugation de 50 mn à $105\,000 \times g$ (30 mg/50).

Conclusions. — Peu d'observations ont été faites sur l'influence du pH sur le V.M.C.S.-A, V.M.C.S.-H et M.D.M.V. Pirone et Anzalone (2) ont purifié le V.M.C.S.-M après clarification de l'extrait virosé par acidification à pH = 4,7, mais en milieu salin (SO_3Na_2 , 0,01 M). Ce procédé de clarification a donné les meilleurs résultats au point de vue infectieux par rapport à d'autres avec V.M.C.S.-H. Par contre, cette technique n'a pas permis de purification convenable de la souche des hauts plateaux malgaches, ce qui peut s'expliquer par le fait que la clarification se fait au pH isoélectrique et doit entraîner au minimum une forte agrégation du virus.

Jean et Sehgal (8) montrent que le M.D.M.V.-A présente un maximum de pouvoir infectieux à pH = 7. Ce pouvoir infectieux diminue rapidement de part et d'autre de la neutralité et, notamment, est nul à pH = 8,5 dans du tampon borate 0,05 M. La chute du pouvoir infectieux vers les pH acides peut s'expliquer facilement par une agrégation du virus. Par contre, la diminution du pouvoir infectieux vers les pH basiques n'a pas été confirmée à Madagascar. De nombreux facteurs peuvent jouer sur ce pouvoir infectieux : molarité des tampons, présence de

(8) J. H. Jean et O. P. Sehgal, *Phytopathology*, 1969, t. 59, p. 1507.

certaines sels, mais également origine des souches virales. Une étude comparative des comportements des différentes souches du V.M.C.S. et de M.D.M.V. en fonction du pH paraît intéressante pour les distinguer.

*(Ecole Nationale Supérieure Agronomique
de l'Université de Madagascar).*
