

ÉTUDE HISTOLOGIQUE ET HISTOCHIMIQUE DES TUMEURS FOLIAIRES DES CANNES A SUCRE ATTEINTES DE LA MALADIE DE FIDJI

J. GIANNOTTI, P. MONSARRAT

*Station de Recherches cytopathologiques, 30 - Saint-Christol
Institut national de la Recherche agronomique*

Office de la Recherche scientifique et technique d'Outre-mer, Tananarive (Madagascar)

SOMMAIRE

L'étude cytochimique des cellules des galles foliaires caractéristiques des cannes à sucre atteintes de la maladie de Fidji, montre que les corps X des tubes criblés et d'autres formations cytologiques des jeunes cellules libériennes sont riches en ARN et en protéines.

INTRODUCTION

Les maladies à virus des végétaux s'accompagnent parfois, dans certains tissus des plantes infectées, d'inclusions cellulaires. L'un ou certains de leurs aspects, tel que la forme, la taille, les affinités tinctoriales, la structure, ont été étudiés au microscope ordinaire et ont permis de les classer (McWHORTER, 1965). Certaines d'entre elles appelées corps α sont définies comme des masses globulaires, amorphes, hyalines, homogènes et vacuolisées. Des études de microscopie en lumière visible et au microscope électronique ont montré que ces éléments sont caractéristiques d'une maladie donnée et formés de divers matériaux cellulaires ; on peut citer comme exemples les masses protoplasmiques associées à une mosaïque du Chou qui ne contiennent aucun virus (RUBIO-HUERTOS, 1956), ou bien les inclusions virales de la jaunisse en mosaïque du Navet (RUBIO-HUERTOS et *al.*, 1967) qui comprennent des éléments de type viral, ou encore les corps α des cellules tumorales des Cannes à sucre atteintes de la maladie de Fidji, formés essentiellement par la coalescence très dense, en un réseau plus ou moins régulier, de particules d'allure virale. (GIANNOTTI, MONSARRAT et VAGO, 1968). Dans beaucoup de cas les caractères histochimiques de ces inclusions cellulaires sont peu connus. Des données de cet ordre peuvent aider à comprendre leur origine et leur

nature. Elles sont particulièrement utiles lorsque la structure de ces inclusions est homogène, comme dans le cas des corps α de la maladie de Fidji, dont nous avons envisagé l'étude en utilisant les tests histo-chimiques mettant en évidence les acides nucléiques, les protéines et quelques autres constituants cellulaires.

MATÉRIEL, ET MÉTHODES

Pour l'histologie des tissus, les coupes sont colorées à l'hématoxyline ferrique à 1 p. 100 dans l'alcool à 70° après mordantage dans l'alun de fer et d'ammonium à 5 p. 100 et différenciées soit dans l'alun à 2 p. 100 soit dans l'alcool à 70° à l'acide picrique. Dans l'étude histo-chimique, les techniques utilisées sont celles citées par LISON (1960). Les acides nucléiques sont mis en évidence par le vert de méthyle-pyronine, procédé LISON (1960), et la gallocyanine, selon la technique de EINARSON (1951). L'ADN est plus spécialement révélé par la réaction de Feulgen et de ROSSENBECK (1924). Les contrôles de ces réactions sont effectuées, par la désoxyribonucléase à 0,01 p. 100 à 37°C pour l'ADN, et pour l'ARN par la ribonucléase, dans les mêmes conditions de température et de concentration. Les protéines sont mises en évidence en utilisant plusieurs réactions. Les radicaux amino sont recherchés par la ninhydrine-Schiff, selon le procédé de YASUMA et ICHIKAWA (1953) et le jaune naphthol S selon la technique de DERTCH (1955). Ces réactions sont contrôlées par la désamination à l'acide nitreux. Les protéines contenant de l'arginine sont révélées par le test de Sakaguchi, selon le procédé de THOMAS-LIEBMAN (1951) ou par une variante simplifiée, adaptée à notre matériel et comportant le traitement des coupes sur lames pendant 6 à 7 mn par une solution extemporanée comprenant 2 cm³ d'une solution de soude à 10 p. 100, deux gouttes de naphthol à 1 p. 100 et deux gouttes d'eau de javel diluée. Le test de Danielli (d'après LISON, 1960) est utilisé pour la recherche des amino-acides phénoliques. Les polysaccharides sont colorés par L'APS selon la technique de MCMANUS (1953) avec les contrôles à l'amylase salivaire à 37°C pendant 1 heure. Les lipides sont recherchés sur les pièces fixées au mélange de Elftman par le noir soudan B dans l'alcool 70° selon LISON et *al.* (1960).

Pour mettre en évidence certaines structures cytologiques, comme les microvacuoles, des fragments de galles sont fixés à la glutaraldéhyde à 6 p. 100, dans un tampon phosphate de pH 7,4, pendant une heure à 4°C, et postfixés à l'acide osmique à 2 p. 100 à la même température pendant 2 heures, déshydratés, inclus à l'araldite coupés à 0,5 u d'épaisseur environ et colorés au bleu de Toluidine, selon la technique de MADEMAN et *al.* (1963).

RÉSULTATS

Étude histologique des galles

Les galles foliaires des cannes atteintes de la maladie à Fidji sont situées sur les nervures à la face inférieure des feuilles. Elles sont de taille très variable allant du millimètre à plusieurs centimètres de long.

Des coupes transversales permettent de voir qu'elles proviennent de la prolifération intense des jeunes cellules libériennes (fig. 1 L) qui se différencient ensuite en tubes criblés (fig. 1 T). La masse cellulaire néoformée, en s'accroissant, comprime et étire les cellules des tissus voisins qui forment autour d'elle une sorte de tissu comprimant selon la taille et l'âge des galles une ou plusieurs couches de cellules (fig. 1 E). Chez les tumeurs âgées, des cellules à parois épaisses, de nature sclérenchymateuse, entourent les tissus néoformés et ne permettent que difficilement l'obtention de coupes sériées.

Au cours de leur différenciation, les tubes criblés, cellules de grande taille aux parois rigides, compriment et souvent divisent le bloc des cellules jeunes. Ce phéno-

mène assez fréquent chez les galles de grande taille, paraît (fig. 2 PC) aboutir à la formation de plusieurs pôles de prolifération cellulaire. Sur les coupes transversales, les galles gardent un contour à peu près circulaire ou ovale, la partie qui fait saillie à l'extérieur étant souvent plus dilatée que celle qui reste enfoncée dans les tissus. Cet aspect est encore accentué par la position du faisceau ligneux (fig. 1 et 2 F) accolé au pôle interne de la tumeur. Toutefois, celui-ci ne participe pas à la néoformation. Ces modifications morphologiques des tissus libériens contrastent avec la présence, au voisinage des galles, de nombreux vaisseaux libéro-ligneux qui ne paraissent pas affectés par de tels changements.

Du point de vue cytologique, la plupart des jeunes cellules tumorales ou certaines d'entre elles en cours de différenciation en tubes criblés, présentent souvent un cytoplasme beaucoup plus dense que celui des cellules libériennes des faisceaux non modifiés. On y rencontre des combinaisons variées de différenciations granulaires (fig. 3 G) de l'ordre de 1 à 2 μ . de diamètre, de réseaux de taille, de forme et de densité variables (fig. 3 R), d'éléments de structure compacte à contours arrondis (fig. 3 C), de 3 à 5 μ , associés ou non au noyau. Les caractères de certaines de ces formations, de 3 à 5 μ de diamètre et même plus, correspondent à la définition de corps α typiques (X). La structure vacuolaire de certains réseaux cytoplasmiques et des corps α , apparaît avec évidence sur les coupes semi-fines colorées au bleu de toluidine (fig. 5 R). Dans les tubes criblés, le cytoplasme disposé en une mince couche pariétale, est généralement peu visible. Dans certains d'entre eux on rencontre un corps α typique globulaire, vacuolisé de 5 à 15 μ . de diamètre (fig. 5 C).

Étude histochimique

Mise en évidence des acides nucléiques. — Comme toutes les inclusions cellulaires associées à des viroses de végétaux étudiées à ce jour, aucune des différenciations cellulaires, à part les noyaux, ne réagit à la réaction de Feulgen. Par contre, la pyronine et la gallocyanine colorent intensément la maille des corps α (fig. 4 C) et les nombreux granules, inclusions et réseaux cytoplasmiques des jeunes cellules libériennes (fig. 3 G. R. C.). Ces éléments se détachent du reste du cytoplasme qui présente une teinte beaucoup plus pâle. Ils ne se colorent plus après l'action de la ribonucléase ou de l'acide trichloracétique à chaud. La présence d'ARN paraît ainsi certaine et permet de les rapprocher de certaines inclusions caractéristiques de maladies à virus de plantes comme la mosaïque du Tabac ou le rougissement en mosaïque des nervures du Trèfle.

Mise en évidence des protéines. — Le test à la ninhydrine-Schiff et la réaction de Deitch, qui révèlent les radicaux aminés sont positifs mais peu intenses et deviennent négatifs après désamination des préparations par l'acide nitreux. La présence de l'un ou plusieurs des amino-acides phénoliques, tyrosine, tryptophane, histidine, est démontrée par la tétrazoréaction de Danielli. Le test de Sakaguchi, ou la réaction simplifiée qui en dérive, adaptée à notre matériel, colore la maille de corps α (fig. 6 C) avec intensité ainsi que les formations réticulées, les granules et les inclusions compactes des jeunes cellules libériennes. La haute spécificité de ce test permet de penser qu'au moins l'une des protéines qui entrent dans la composition des inclusions cyto-

plasmiques liées à la maladie de Fidji contient de l'arginine. L'examen de coupes immédiatement voisines montre que les éléments pyroninophiles se colorent intensément par le test de Sakaguchi, alors que le reste du cytoplasme réagit à peine.

Recherche des polysaccharides et des corps gras. — Les corps α , et les autres différenciations cytologiques caractéristiques des cellules tumorales présentent une APS positivité très faible, qui n'apparaît pas après l'action de l'amylase salivaire.

Après fixation au mélange de Elftman, aucune substance de nature lipidique n'a pu être mise en évidence par le noir Soudan B, ce qui confirme les premières observations de microscopie électronique où aucune plage osmiophile attribuable à la présence de corps gras n'a pu être décelée.

DISCUSSION

La détection histochimique des acides nucléiques, des protéines et d'autres constituants cellulaires appliquée à l'étude des inclusions virales des végétaux malades, est susceptible de fournir des données qui, en complétant certains aspects connus de leur structure, permettent de mieux préciser leur nature et leur origine. Les cristaux associés au virus du rougissement en mosaïque des nervures du trèfle, contiennent de l'ARN et sont vraisemblablement formés de virus (MC WHORTER, 1965). BALD en 1949 et RAWLINS en 1957, ont montré que les inclusions cristallisées des plants de tabac infectés par le virus de la mosaïque du tabac contiennent de l'ARN. Leur structure virale *in situ* a été démontrée récemment par WARMKE et ADWARSON (1966). La protéine de ce virus contient un pourcentage élevé (10 p. 100) d'arginine, et sa mise en évidence peut aussi être utilisée pour la détection des inclusions formées de virus (RAWLINS et *al.* 1956). Les corps α contiennent de l'ARN et des protéines riches en arginine, et selon toutes vraisemblance, les particules d'allure virale qui forment leur réseau ont la même composition. Ces données histochimiques renforcent l'hypothèse de la nature virale de ces éléments qui n'était fondée que sur la structure des particules. L'absence d'ADN permet d'avancer que ce virus appartient au groupe des ribovirus.

Les corps α de la maladie de Fidji, peuvent se comparer, sous certains aspects morphologiques et histochimiques aux « sphérules », inclusions virales des cellules tumorales décrites par LITTAU et BLACK (1952) chez *Rumex acetosa* L., infecté par le virus de *Wound-Tumor*. Elles sont amorphes, hyalines, et sont situées dans le cytoplasme cellulaire ; mais contrairement aux corps α , elles sont rarement vacuolisées et leur taille ne dépasse pas 4 μ . Comme les corps α , elles sont formées de protéines dont l'une d'elles au moins, contient de l'arginine, et vraisemblablement de l'ARN, tandis que ni les lipides, ni les polysaccharides ne participent à leur composition. Ces deux types d'inclusions sont différents de celles associées au virus des stries chlorotiques de la Canne à sucre, qui sont sphériques et formées de mucilage ou de matériel lipidique (ABBOTT et SASS, 1945).

Les données histochimiques concernant les tumeurs foliaires de la maladie de Fidji, montrent que les plus jeunes de leurs cellules présentent des différenciations cytoplasmiques de formes variées, riches en ARN et en protéines, certaines d'entre

elles ayant des caractères des inclusions virales typiques. Ces observations orientent nos travaux vers l'étude des formations caractéristiques des cellules encore peu différenciées des tumeurs des cannes malades.

Reçu pour publication en septembre 1968.

SUMMARY

HISTOLOGICAL AND HISTOCHEMICAL STUDY OF THE TUMOR OF SUGAR CANE AFFECTED BY THE FIDJI DISEASE

An histological study of the tumor of sugar cane affected by the Fidji disease indicates these galls derive from proliferation of some young phloem cells which will grow into sieve tube. The cells contain a granular material, a particular cytoplasmic network, more or less dense inclusions and typical α bodies. From the cytochemical point of view, these structures are rich in RNA and protein.

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- ABBOIT F. V., SASS J. E., 1945. Pathological histology of sugar cane affected with chlorotic streak. *J. agric. Res.*, **70**, 201-207.
- BALD J. G., 1949. Additional methods for fixing and staining viruses in infected plant tissues. *Ann. J. Bot.*, **36**, 335-342.
- GIANNOTTI J., MONSARRAT P., VAGO C., 1968. Structure des corps X des tumeurs foliaires de cannes à sucre atteintes de la maladie de Fidji. *Ann. Epiphyties*, n° hors-serie, 31-35.
- KUNKEL L. O., 1924. Histological and Cytological studies on the Fidji disease of sugar cane. *Bull. Exper. Stn., HSPA, Bot. Series*, 3, Part. II.
- LISON L., 1960. *Histochimie et cytochimie animales*. Gauthier Villars Paris.
- LITTAU V. C., BLACK L. M., 1952. Spherical inclusions in plant tumors caused by a virus. *Amer. J. Bot.*, **39**, 87-95.
- MADEMAN R., STEPMANN G., KUHNEL W., 1963. Toluidinblau-Färbung von Epon-Dünnschnitten. *Mikroskopie*, **21**, 29-31.
- MC WHORTER, 1965. Plant virus inclusions. *Ann. Rev. Phytopathol.* **3**, 287-312.
- RAWLINS T. E., WEIERICH A. J., SCHLEGEL D. A., 1956. A histochemical study of certain plant viruses by means of the Sakguchi reaction for arginine. *Virology*, **2**, 208-11.
- RAWLINS T. E., 1957. A modification of BALD's stain for viruses and for cell inclusions associated with virus infections. *Phytopathology*, **47**, 307.
- RUBIO HUERTOS M., 1956. Origin and composition of cell inclusions associated with certain tobacco and crucifer viruses. *Phytopathology*, **46**, 533-566.
- RUBIO-HUERTOS M., VELA M., LOPEZ-ABELLA D., 1967. Crystalline arrays of spherical particles in turnip yellow mosaic virus infected cells. *Virology*, **33**, 438-44.
- WARMKE H. E., EDWARDSON J. R., 1966. Electron microscopy of crystalline inclusions of tobacco mosaic virus in leaf tissue. *Virology*, **30**, 45-57.

PLANCHE I

FIG. 1. — *Vue d'ensemble d'une jeune galle*

L. jeunes cellules libériennes

T. tubes criblés

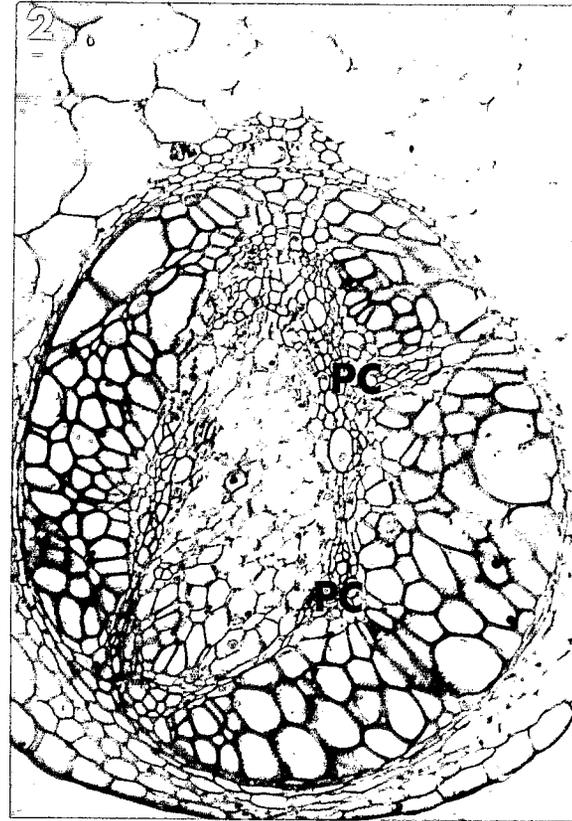
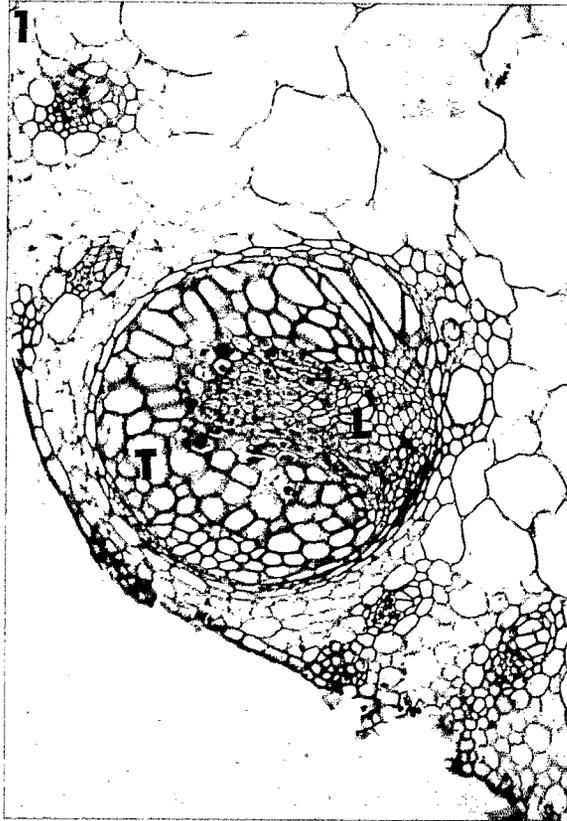
F. faisceaux ligneux

Hématoxyline ferrique. (\times . 100).

FIG. 2. — *Vue d'ensemble d'une galle plus âgée*

PC, zone de prolifération cellulaire

Hématoxyline ferrique. (\times . 105).



J. GIANNOTTI, P. MONTSARRAT

PLANCHE II

FIG. 3. — Vue de jeunes cellules libériennes d'une tumeur.

C. inclusions compactes;

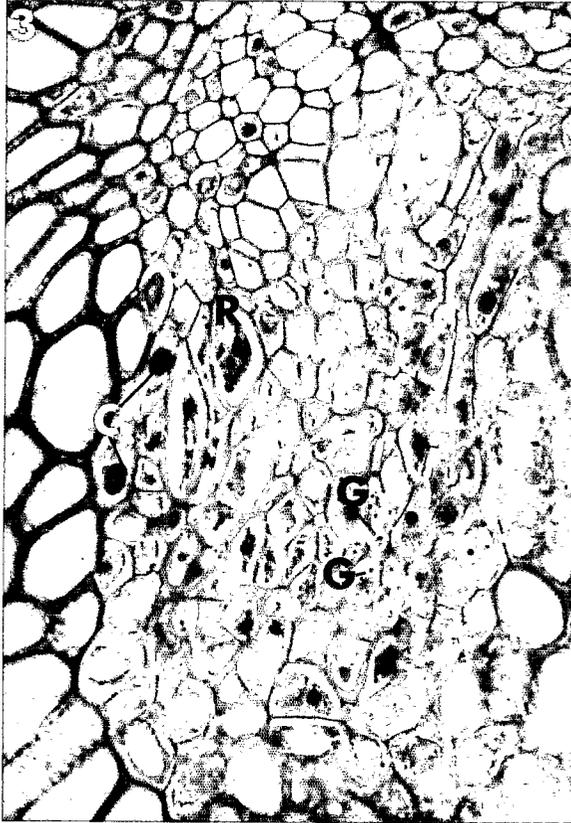
G. différenciations granulaires;

R. réseau cytoplasmique.

Vert de méthyle-pyronine. ($\times 400$).

FIG. 4. — Tube criblé.

C. corps X typiques. ($\times 1000$).

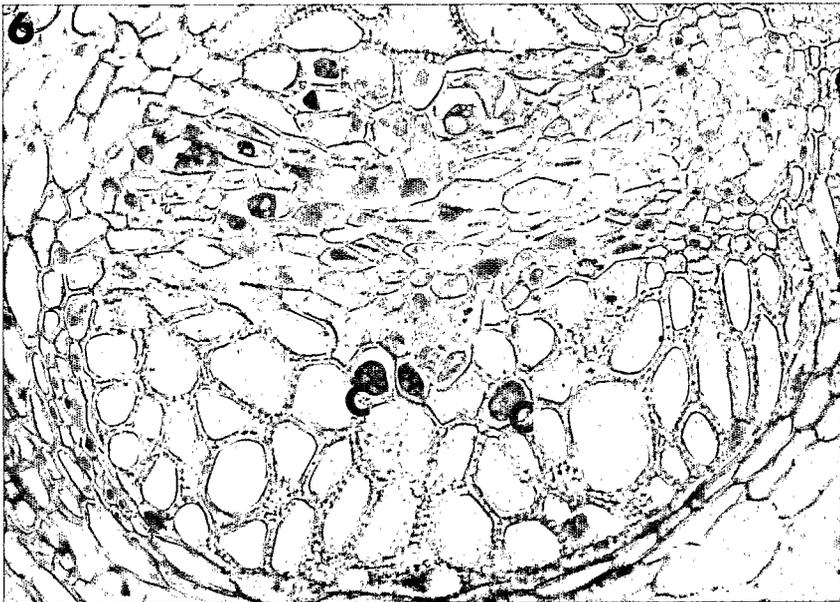
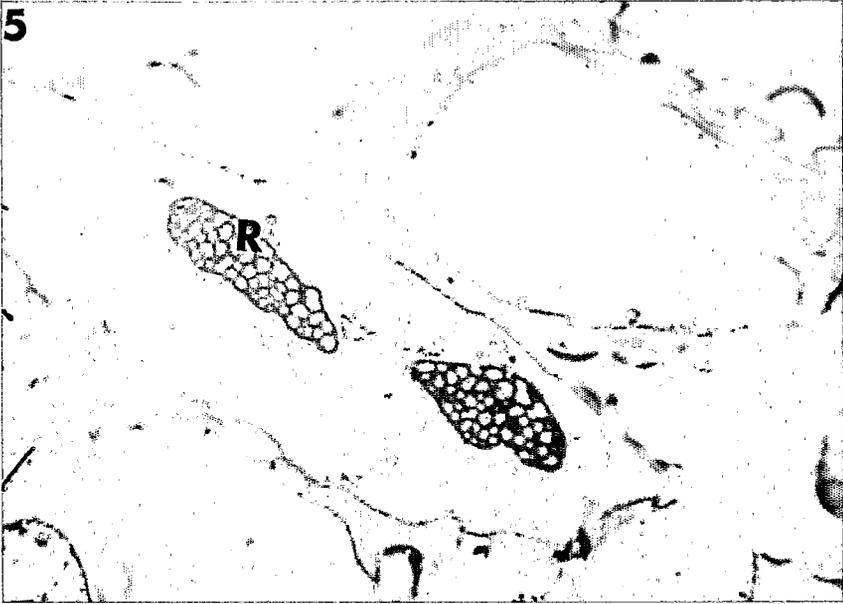


J. GIANNOTTI, P. MONTSARRAT

PLANCHE III

FIG. 5. — Coupe semi-fine. Tube criblé.
R. réseau cytoplasmique.
Bleu de toluidine. ($\times 1000$).

FIG. 6. — C. Corps X. Mise en évidence de l'arginine. ($\times 400$).



J. GIANNOTTI, P. MONTSARRAT

Phyt

Ann. Épiphyties, 1968, 19 (4), 707-712.

ÉTUDE HISTOLOGIQUE ET HISTOCHIMIQUE
DES TUMEURS FOLIAIRES DES CANNES A SUCRE
ATTEINTES DE LA MALADIE DE FIDJI

J. GIANNOTTI, P. MONSARRAT

*Station de Recherches cytopathologiques, 30 - Saint-Christol,
Institut national de la Recherche agronomique
Office de la Recherche scientifique et technique d'Outre-Mer,
Tananarive (Madagascar)*

Annales des Épiphyties

INSTITUT NATIONAL DE LA RECHERCHE AGRONOMIQUE
149, rue de Grenelle, Paris-7^e

O. R. S. I. O. M.

8 MAI 1969

Collection de Référence

n° 13190