

N° d'ordre :

## THESE

présentée à la

FACULTÉ DES SCIENCES DE L'UNIVERSITÉ DE STRASBOURG

pour obtenir

LE TITRE DE DOCTEUR SPÉCIALISÉ EN BIOCHIMIE (3<sup>e</sup> CYCLE)

par

**Louise GIVORD**

Chargé de Recherche à l'O.R.S.T.O.M.

---

### **Identification, Purification et Description de Quelques Propriétés d'un Nouveau Virus: le Virus de la Mosaïque du Gombo**

---

Soutenue le 13 Juillet 1971 devant la commission d'examen :

M <sup>r</sup> .	L. HIRTH	Président
M <sup>r</sup> .	H. DURANTON	Examineur
M <sup>lle</sup>	G. LEBEURIER	Examineur

**President : Professeur G. OURISSON**  
**Vice-Présidents : Professeur A. CHAUMONT**  
**Professeur G. LAUSTRIAT**  
**Secrétaire Général : G. KIEHL**

**PROFESSEURS et MAITRES DE CONFERENCES des U.E.R.**  
**RESPONSABLES DES DOCTORATS es-SCIENCES**

**Doyens Honoraires : A. KIRRMANN, P. LACROUTE, H. J. MARESQUELLE, J. H. VIVIEN, G. MILLOT**

**Professeurs Honoraires : P. DE BEAUCHAMP, L. BOISSELET, H. CARTAN, G. CERF, G. CHABAUTY, A. CHRETIEN, J. DENY, Ch. EHRESMANN, Mlle. S. GILLET, A. HEE, R. HOCART, A. KIRRMANN, G. LEMEE, P. L'HERITIER, A. LICHNEROWICZ, H. J. MARESQUELLE, L. NEEL, Ch. SADRON, F. TERROINE, H. VILLAT, Et. WOLFF, J. YVON, M. FRECHET, H. WEISS**

**Maître de Conférences Honoraire : R. WEIL**

**Professeur :**

H.	FORESTIER .....	T.	Chimie générale
J.	ROTHE .....	T.	Physique du Globe
P.	LACROUTE .....	T.	Astronomie
J.H.	VIVIEN .....	T.	Zoologie et Embryologie expérimentale
A.	MAILLARD .....	T.	Physicochimie du Pétrole
S.	GORODETZKY .....	T.	Physique générale et Physique nucléaire
L.	SACKMANN .....	T.	Mécanique des Fluides
J.	BYE .....	T.	Chimie Physique
Mlle.	M. PEREY .....	T.	Chimie nucléaire
S.	GOLDSZTAUB .....	T.	Minéralogie et Pétrographie
P.	JOLY .....	T.	Biologie générale
E.	BENOIT .....	T.	Physicochimie macromoléculaire
P.	CUER .....	T.	Physique générale et physique corpusculaire
G.	MILLOT .....	T.	Géologie et Paléontologie
R.	LECOLAZET .....	T.T.P.	Physique du Globe
H.	SAUCIER .....	T.T.P.	Minéralogie
R.	ROHMER .....	T.	Chimie minérale
Mlle.	A. GAGNIEU .....	T.T.P.	Botanique
S.	NIKITINE .....	T.	Physique générale
P.	STUTINSKY .....	T.	Physiologie générale
B.	WURTZ .....	T.T.P.	Chimie biologique
J.	BRENET .....	T.	Electrochimie
G.	OURISSON .....	T.T.P.	Chimie
A.	COCHE .....	T.T.P.	Physique nucléaire
R.	CERF .....	T.	Physique générale
J.	FRENKEL .....	T.T.P.	Mathématiques
A.	DELUZARCHE .....	T.T.P.	Chimie
R.	ARMBRUSTER .....	T.T.P.	Physique
A.	ROCHE .....	T.T.P.	Physique du Globe
L.	HIRTH .....	T.	Microbiologie
A.	FUCHS .....	T.	Mécanique rationnelle
A.	GALLMANN .....	T.T.P.	Physique
P.	MIALHE .....	T.T.P.	Physiologie animale
J.P.	EBEL .....	T.	Chimie biologique
J.	PARROD .....	T.T.P.	Chimie
Mme.	D. MAGNAC .....	T.T.P.	Physique
M.	DAUNE .....	P.S.C.	Physique
J.P.	ADLOFF .....	T.T.P.	Chimie nucléaire
D.	BERNARD .....	T.T.P.	Méthodes mathématiques de la physique
E.	DANIEL .....	T.	Physique expérimentale
P.	CHEVALLIER .....	T.	Physique
J.	GREMILLARD .....	T.T.P.	Mécanique des Fluides
P.	CARTIER .....	T.	Mathématiques

G.	REEB .....	T...	Topologie
J.	WUCHER .....	P.S.C.	Physique
Mme.	M. BRINI .....	T.T.P.	Chimie
H.	DURANTON .....	T.T.P.	Botanique
R.	WEISS .....	T.T.P.	Chimie
P.	FEDERLIN .....	T.T.P.	Chimie
J.P.	SCHWING .....	T.T.P.	Chimie
M.	SIESKIND .....	P.S.C.	Physique
G.	MONSONEGO .....	T.	Physique théorique
P.	GABRIEL .....	T.T.P.	Mathématique
C.	WIPPLER .....	T.	Physicochimie des hauts Polymère indus- triels
P.A.	MEYER .....	T.T.P.	Mathématiques
G.	WEILL .....	P.S.C.	Physique
A.	CLAUSS .....	P.S.C.	Chimie
E.	FOLLENIUS .....	P.S.C.	Zoologie
J.	LUCAS .....	T.T.P.	Géologie
J.J.	THIEBOLD .....	P.S.C.	Biologie animale
G.	GLAESER .....	T.	Mathématiques
J.H.	WEIL .....	P.S.C.	Chimie biologique
D.	FOATA .....	T.T.P.	Mathématiques
X.	FERNIQUE .....	P.S.C.	Mathématiques
F.	GAUTIER .....	P.S.C.	Physique
V.	AVANISSIAN .....	T.	Analyse supérieure
F.	LACROUTE .....	T.	Biologie végétale
J.P.	EBERHART .....	P.S.C.	Minéralogie
J.M.	LEHN .....	P.S.C.	Chimie
Cl.	ROBERT .....	P.S.C.	Physique
F.	BECKER .....	P.S.C.	Physique mathématique
M.	KAROUBI .....	P.S.C.	Mathématiques
A.	MIGNOT .....	P.S.C.	Mathématiques appliquées

#### Professeurs associés :

A. BANDERET (B.A.H.P.) - B. BENJAMINOV (Chimie) - B. DADÉ (Math.) - H. DELLMANN (Physiol.) - H. HAKEN (Physique) - L. LEITE-LOPEZ (Physique) - M. VAN-REGENMORTEL (Botanique) - K.S. SPIEGLER (Chimie) - J. WALSCH (Math.) 6

#### Titres de Conférences et Chargés d'enseignement :

M.	GOUNOT .....	Botanique
J.	DEHAND .....	Chimie minérale
C.	GODBILLON .....	Mathématique
J.	ROUX .....	Botanique
R.	VOLTZ .....	Physique théorique
A.	MICHARD .....	Géologie
Y.	BOULANGER .....	Chimie biologique
J.P.	BRETAGNOLLE .....	Mathématiques
JJ	RIBHL .....	Chimie
Cl.	DELLACHERIE .....	Mathématiques
M.	GROSMANN .....	Physique
M.	DAIRE .....	Chimie physique industr. et Sc. des Matériaux
F.	DUNOYER de SEGONZAC ...	Géologie
B.	BIANCO .....	Mathématiques
J.	MARTINET .....	Mathématiques
J.P.	JOUANOLOU .....	Mathématiques
Ph.	ROPARTZ .....	Psycho-physiologie
Ph.	RICHARD .....	Physiologie animale
J.	SOLLADIE .....	Chimie organique
P.	BENVENISTE .....	Physiologie végétale

#### Titres de Conférences associées :

P. FELLNER (Biochimie) - St. PINE (Chimie) -

Ma profonde gratitude va à Monsieur le Professeur CAMUS, Directeur Général de l'Office de la Recherche Scientifique et Technique Outre Mer, qui a permis la création du Laboratoire de Virologie d'Adiopodoumé où la majeure partie de ce travail a été réalisée.

Je tiens à exprimer ma profonde et respectueuse reconnaissance à Monsieur le Professeur HIRTH, qui m'a accueillie dans son Laboratoire, a participé à la création du Laboratoire d'Adiopodoumé et m'a toujours prodigué de précieux conseils et encouragements.

Le Docteur MARTIN a bien voulu me faire l'honneur de me parrainer à l'ORSTOM. Je le prie de trouver ici le témoignage de ma reconnaissance.

J'exprime ma vive gratitude à Monsieur le Professeur DURANTON qui a bien voulu accepter d'examiner ce mémoire.

Mes plus vifs remerciements vont au Docteur LEBEURIER, Maître assistant à la Faculté des Sciences de Strasbourg, qui m'a toujours aidée de ses nombreux et précieux conseils et qui a bien voulu faire partie du jury de cette thèse.

Je remercie très sincèrement Monsieur VUITTENEZ, Directeur de la Station de Phytopathologie de l'Institut National de la Recherche Agronomique de Colmar, pour son aide et sa collaboration dans la partie sérologique de ce travail.

J'ai pu réaliser les photographies de microscopie élec-

tronique grâce à la collaboration du Docteur WURTZ. Qu'il trouve ici l'expression de ma profonde reconnaissance.

Je n'aurais garde d'omettre ce que je dois aux Docteurs SILBERSCHMIDT, BOS, SEMAL et DEVERGNE qui m'ont envoyé les échantillons permettant les tests sérologiques.

Je remercie Monsieur COHIC et le Docteur HILLE RIS LAMBERS pour la détermination des insectes vecteurs.

Enfin que mes collègues, amis et collaborateurs techniques qui, en quelques façons, m'ont aidée dans cette recherche, en particulier Messieurs DUBERN, PETIOT, DANEY de MARCILLAC, ROLLIN, MOBIO et AHO, soient très sincèrement remerciés pour leur gentillesse.

### Liste des abréviations

VMG	Virus de la mosaïque et du "vein banding" du Gombo
AMV	"Abutilon mosaic virus" = virus de la mosaïque de l'Abutilon
VMB	Virus de la mosaïque du Brome
H.	Hibiscus
Ch.	Chenopodium
S	Coefficient de sédimentation : Svedberg
EDTA	Ethylène diamine tetra acétate de sodium
Tampon PNa	Tampon phosphate phosphate de sodium 0,01 M, pH 7,0

## INTRODUCTION

La connaissance des virus des Malvacées remonte assez loin dans l'histoire des virus des plantes puisque, en 1868, le symptôme de "variegation" sur l'Abutilon (*Abutilon striatum* Dicks. cv. *Thompsonii*) a été signalé dans un journal d'agronomie anglais. La plante aux jolies feuilles mosaïquées de vert et de jaune a été rapportée du Brésil ou du Guatemala. Les horticulteurs trouvent rapidement que la "variégation" n'est pas transmise par graine mais seulement par bouture et greffage (Klinkowski, 1967). D'après Bawden (1950), aux environs de 1870, l'Abutilon malade est devenu une plante ornementale très populaire. Il faut attendre 1904 pour que Baur s'y intéresse d'un point de vue scientifique; il décrit ce qu'il appelle la chlorose infectieuse des Malvacées (*infektiöse Chlorose der Malvaceen*) et pense que l'agent causal de la mosaïque n'est pas un organisme vivant mais une substance infectieuse parce que les plantes malades placées à côté des plantes saines ne les contaminent pas! Alors que la notion de virus est née, Orlando et Silberschmidt publient en 1946, leur travail sur la transmission de la chlorose des Malvacées par *Aleyrodes*, réalisé dans le pays d'origine de la maladie, c'est à dire au Brésil. De 1950 à 1965, de nombreux virus des Malvacées sont décrits et étudiés dans divers pays tel le "Yellow vein mosaic" d'*Hibiscus esculentus* signalé aux Indes (Capoor and Varma, 1950), tel encore le "Malva vein clearing" en Allemagne étudié par Hein (1956), et bien d'autres. Pendant cette période, la chlorose infectieuse fait toujours l'objet de plusieurs articles, au Brésil, où elle est maintenant appelée: "Abutilon mosaic virus" (AMV) et en 1965 le virus est observé en microscopie électronique (Sun).

La mosaïque et le " vein banding" de *H. esculentus* n'ont jamais été décrits jusqu'à présent. Nous les avons observés pour la première fois dans les champs de la Station d'Expérimentation Agricole de Bouaké à la fin du mois de décembre 1968. La maladie avait atteint 50% des pieds alors âgés de trois semaines et avait nettement retardé leur croissance. Nous avons retrouvé la maladie dans toutes les cultures villageoises que nous avons observées dans les environs d'Abidjan. Des observations ultérieures dans les champs d'expérimentation montrèrent que les pieds malades n'arrivaient pas à fructification ou tout au moins avaient un rendement faible.

*Hibiscus esculentus* L. (Malvacées), du nom vernaculaire d'Afrique Occidentale: Gombo, est une plante maraîchère très appréciée par les Ivoiriens car elle constitue le liant des sauces accompagnant le Foutou, plat national à base d'Ignome, de Manioc ou de Banane. On retrouve le Gombo sous le nom de Bhendi aux Indes où il est également utilisé comme plante maraîchère ainsi qu'en Amérique où il est appelé Okra qui est son nom le plus courant dans la littérature. Nous avons choisi de nommer le virus de la mosaïque et du "vein banding" de *H. esculentus*: virus de la mosaïque du Gombo (VMG). En anglais, nous lui donnons le nom de: Okra mosaic virus dont l'abréviation OMV permet de ne pas le confondre avec beaucoup d'autres virus.

Il faut dire également que le Gombo est un succédané du Jute qui pourrait être utilisé pour la fabrication de sacs et de ficelles (Kirby, 1948). La qualité de sa fibre est tout à fait équivalente à celle du Jute et on se demande pourquoi les Anglais ont choisi *Corchorus* sp. plutôt que *H. esculentus* pour industrialiser cette production au début du 19<sup>ème</sup> siècle.



Lorsque nous avons entrepris d'étudier le VMG nous avons fait le point des travaux publiés sur les virus des Malvacées et rassemblé tous les critères d'identification utilisés pour l'étude de ces virus et en particulier pour l'AMV, le virus des Malvacées le mieux connu.

Le travail que nous présentons ici consiste donc premièrement en l'identification du VMG (mode de transmission, plantes hôtes, symptomatologie, propriétés biologiques, morphologie) pour le comparer aux virus déjà décrits et deuxièmement en la description de quelques propriétés physico-chimiques (purification, centrifugation en gradient, spectre en UV, centrifugation analytique, nature de l'acide nucléique, propriétés sérologiques).

L'ensemble des résultats, discutés dans la conclusion, montre que le VMG s'avère être un nouveau virus.

## MATERIELS ET METHODES

### I - SOURCE DU VIRUS

L'inoculum initial du VMG a été récolté dans les champs de la Station d'Expérimentation Agricole de Bouaké, situé au centre de la Côte d'Ivoire en zone de savane. La virose a été également observée dans les cultures villageoises des environs d'Abidjan (Basse Côte). Ces derniers inoculums ont redonné par transmission mécanique les mêmes symptômes que l'inoculum de Bouaké. Par la suite le virus a été transmis à des plantes se développant sous abris au Laboratoire de Virologie d'Adiopodoumé; il y est multiplié et les feuilles récoltées sont stockées au congélateur ou utilisées fraîches.

### II - MULTIPLICATION DU VIRUS

Pour obtenir des quantités importantes de virus, nous utilisons l'hôte naturel systémique du VMG: *H. esculentus* et préférentiellement une variété américaine *Clemson Spineless*. Cette plante est cultivée sous moustiquaire rigide doublée de voile de tergal, exposée aux conditions climatiques de la région. Ces conditions varient avec la saison et sont les suivantes: en saison des pluies la température varie de 20 à 30°C et l'humidité de 90 à 100%; en saison sèche la température varie de 24 à 38°C et l'humidité de 65 à 90%. La durée du jour est de 12 heures sur 24 pour toute l'année. La terre est stérilisée par autoclavage en vue d'éliminer d'éventuelles transmissions de virus par le sol.

### III - METHODES D'ETUDE DES PROPRIETES BIOLOGIQUES

On entend par cette désignation l'étude de la concentration du pouvoir pathogène du virus subissant différents traitements telles la chaleur, l'incubation à température ambiante, la déshydratation, la congélation-décongélation répétée, ou une simple dilution.

Au moment où nous avons commencé notre travail, nous ne connaissions pas encore de technique de purification de ce nouveau virus, aussi avons-nous fait ces études sur l'extrait brut.

En virologie végétale, pour évaluer le pouvoir pathogène d'une préparation virale, on utilise la technique dite des "lésions locales", or ce n'est qu'à un stade très avancé de notre étude que nous avons pu montrer que *Cucumis sativus* L. était un hôte à lésions locales pouvant éventuellement servir à tester le pouvoir pathogène des préparations. En conséquence, nous avons employé à cet effet, la méthode de Raymer et Diener (1969) réalisée sur l'hôte systémique *H. esculentus*.

#### 1 - Préparation de l'extrait brut

Une vingtaine de jours après l'inoculation, les feuilles de Gombo présentant des symptômes sont récoltées et broyées dans un mortier réfrigéré en présence d'un volume de tampon PNa (V/P=1) et de sable de Fontainebleau préalablement stérilisé. Le broyat est pressé au travers de quatre lits de gaze et le filtrat obtenu est utilisé pour les expériences.

## 2 - Point de dilution limite

A partir du filtrat, des dilutions en série de  $10^{-1}$  à  $10^{-8}$  sont faites dans le tampon PNa. Chaque dilution est inoculée à un groupe de 10 Gombos au stade cotylédonaire.

## 3 - Point de thermoinactivation

Des tubes à hémolyse en verre Pyrex sont préparés dans des bain-marie thermostatés aux températures suivantes: 50, 55, 60, 65, 70, 72, 74, 76, 78, 80, 82, 85, 90, 95 et 100°C. 2 ml de filtrat (§ III-I) sont versés dans chaque tube au temps zéro. Ils sont maintenus aux différentes températures pendant 10 minutes puis la réaction est arrêtée en les plongeant dans un bain de glace concassée. L'extrait brut de chaque tube est testé selon la méthode de Raymer et Diener.

## 4 - Longévité in vitro

Une série de 7 tubes à hémolyse est préparée; chaque tube est rempli de 2 ml de filtrat de Gombo virosé. Ils sont immédiatement bouchés avec du parafilm et exposés à température ambiante (24°C) pendant les temps suivant: 3, 5, 7, 9, 10, 11, 12 et 14 jours. Le pouvoir pathogène de la préparation est testé à la fin de chaque temps d'exposition.

## 5 - Résistance à la dessiccation

Une vingtaine de feuilles de Gombo est récoltée, en-

filée et tendue dans le laboratoire. Chaque semaine, une feuille est broyée dans un mortier en présence de tampon PNa ( V/P = 10) et le jus brut est inoculé à 10 jeunes Gombos.

#### IV - ANALYSE SPECTROPHOTOMETRIQUE

L'analyse spectrophotométrique permet de savoir si l'on a affaire à une nucléoprotéine en utilisant la valeur du rapport de la densité optique mesurée à 260 nm à la densité optique à 280nm. Cette valeur indique la proportion relative d'acide nucléique et de protéine (Lebeurier et Hirth, 1966). Aussi après chaque purification la suspension virale est-elle lue au spectrophotomètre Zeiss PMQ II ou enregistrée en continu au spectrophotomètre Beckman DB (enregistreur "Five inches"). Le même procédé est utilisé pour analyser les fractions des pics de gradients de saccharose et de chlorure de césium.

#### V - MICROSCOPIE ELECTRONIQUE

Des observations au microscope électronique sont faites à l'aide de la technique de coloration négative afin de déterminer la morphologie du VMG. Nous avons préparé de très nombreuses grilles qui ont été envoyées à Strasbourg (Laboratoire des Virus des Plantes, Institut de Botanique) où elles ont été examinées au microscope électronique Siemens Elmiskop 1A, à un grossissement de 40 000 pour la plupart et quelques unes à 80 000. Les grilles ont été faites soit à partir de suspensions purifiées après ultracentrifugation soit à partir de fractions de gradient de saccharose ou de gradient de chlorure de césium. Les suspensions sont toujours dialysées au

préalable contre du tampon acétate de sodium 0,05 M à pH 5,8 pendant 24 heures. Une goutte de suspension virale est déposée sur une grille de cuivre recouverte de formvar; on y ajoute quelques gouttes d'acétate d'uranyle à 1% additionnée de EDTA à 0,5% à pH 7,0 (Mellena and al., 1968) et l'excès de liquide est retiré après une minute.

## VI - ULTRACENTRIFUGATION ANALYTIQUE

Des préparations purifiées de VMG sont analysées par ultracentrifugation analytique (ultracentrifugeuse analytique Beckman Spinco Model E), par le système optique Schlieren.

## VII - ULTRACENTRIFUGATION EN GRADIENTS

### 1 - Gradient de chlorure de césium

La technique des gradients de sels lourds a donné de bons résultats pour obtenir des suspensions purifiées de virus, particulièrement chez les virus des animaux. Nous l'avons adaptées à notre matériel et avons essayé de voir si le VMG conserve sa structure quand il est sédimenté en présence de chlorure de césium. Par cette technique, on peut également savoir si ce virus est représenté par un ou plusieurs composants. La technique utilisée est la suivante: 4 ml de chlorure de césium à 44% dans le tampon PNa sont versés dans chaque tube de centrifugation de rotor SW 39. 0,5 ml de suspension virale (densité optique à 260 nm = 20) est déposé au sommet du tube. La centrifugation est faite à 175 000  $g_{max}$  pendant 18 heures, freinage inclus, en ultracentrifugeuse Beckman Spinco L2 50 (Brakke, 1960). La récolte du gradient (fractions de

3 gouttes) est réalisé en perçant la base du tube.

## 2 - Gradient de saccharose

Nous avons également fait des gradients de saccharose de 14 - 38%, préparés par couches de 38, 36, 34 ....., 14% (13 couches) en tampon PNa additionné de EDTA 0,001 M. Les gradients sont entreposés 24 heures à 4°C avant utilisation. Chaque tube de centrifugation contient 25 ml de solution de saccharose sur lesquels sont déposés 2 ml de suspension virale diluée dans le même tampon (densité optique à 260 nm = 65). L'ultracentrifugation de 2 h 1/4, non compris l'arrêt sans frein, est effectuée à 90 000  $g_{max}$  (rotor SW 25-1, ultracentrifugeuse Beckman Spinco Model L2 50). Des fractions de 8 gouttes sont récoltées en perçant la base des tubes.

## 3 - Lecture des gradients

La lecture des gradients est réalisée au spectrophotomètre Zeiss PMQ II en diluant convenablement les fractions dans le tampon de centrifugation. La densité optique de chaque fraction est lue à 280, 260, 250 et 240 nm.

## VIII - SEROLOGIE

A l'aide de cette technique hautement spécifique nous avons tenté d'identifier le VMG. Les suspensions de virus purifié de VMG sont mises en présence d'antisérums spécifiques de virus bien connus tels le virus de la mosaïque du Concombre, le virus de la mosaïque du Brome et bien d'autres qui semblaient avoir des

parentées avec le VMG. De même, les suspensions purifiées ou les extraits bruts des virus déjà connus sont mis en présence d'anti-sérum spécifique du VMG. En première étape, nous avons préparé du sérum anti-VMG.

## 1 - Fabrication de l'antisérum

### a. Préparation de l'inoculum

Pour chaque injection au Lapin, une nouvelle purification est faite à partir de 200 g de feuilles congelées suivant la méthode décrite tableau 3. Le culot de la dernière ultracentrifugation de VMG est remis en suspension dans 1,5 ml de tampon PNa additionné de NaCl 0,15 M pH 7 et centrifugé pendant 20 minutes à 12 000 g. Le surnageant, analysé au spectrophotomètre à 260 nm donne une densité optique de 250 à 300. IL est émulsionné avec 1 ml d'adjuvant incomplet de Freund (Difco).

### b. Technique d'inoculation

Le Lapin est traité selon le schéma suivant: 1er jour: injection intramusculaire de 2,5 ml de l'émulsion dans la cuisse gauche; 8ème jour: injection intramusculaire de 2,5 ml de l'émulsion dans la cuisse droite; 15ème jour: injection intramusculaire de 2,5 ml de l'émulsion dans la cuisse gauche, et ainsi de suite tous les sept jours jusqu'au 36ème jour (6 injections). 2 jours avant la 3ème injection, un échantillon de sang (2 ml) du Lapin est prélevé dans une veine marginale de l'oreille pour déterminer le titre du sérum. Cette opération est répétée chaque semaine et permet de suivre l'évolution du titre du sérum en fonction du temps. Le 43ème jour, le Lapin est sacrifié. L'antisérum obtenu avec cette méthode a toujours un titre élevé: 1/2048 ou au minimum 1/1024. Il



est stocké à  $-20^{\circ}\text{C}$  par fractions de 2 ml en tubes à hémolyse en verre Pyrex jusqu'à utilisation.

## 2 - Test sérologique

Le test de double diffusion en gel d'agar (Oudin, 1955; van Regenmortel, 1966) est employé pour tester l'identité ou les relations antigéniques du VMG avec d'autres virus.

Les expériences sont réalisées dans des boîtes de Pétri à fond plat de 14 cm de diamètre contenant 80 ml de gel d'agar à 0,7% (Spécial Agar Noble Difco) additionné de 0,9% de NaCl et de 0,1% de  $\text{NaN}_3$  pour empêcher le développement de micro-organismes. Les boîtes sont conservées à  $4^{\circ}\text{C}$ . Pour faire les trous dans la gélose, on utilise un emporte-pièce de 6 mm de diamètre pour les trous périphériques du dessin, formant un octogone, et de 7 mm de diamètre pour le trou central. La distance du bord du trou central au bord des trous périphériques est de 6 mm. L'antisérum est déposé dans le trou central et les trous latéraux sont remplis d'antigène. Les arcs de précipitation sont dessinés et photographiés en utilisant un éclairage latéral.

## IX - TRANSMISSION MECANIQUE

Les inoculations mécaniques sont faites soit à partir d'un extrait brut (§ III-1) soit à partir de suspensions purifiées. Dans tous les cas, une goutte de préparation diluée en tampon PNa est déposée à l'aide d'une pipette sur les feuilles primaires ou cotylédonnaires des plantes préalablement saupoudrées de célite (abrasif constitué par une poudre de Diatomées). La goutte de

suspension virale est étalée sur la feuille en frottant légèrement avec le doigt. Puis la feuille est arrosée avec de l'eau distillée pour éliminer la célite et le virus restant qui n'a pas pénétré dans la plante.

## X - TRANSMISSION PAR INSECTES

La transmission mécanique ayant donné d'excellents résultats il peut paraître inutile d'étudier la transmission par insectes qui est toujours plus difficile et moins pratique. C'est par soucis de comparer valablement le virus de la mosaïque du Gombo à d'autres virus que nous avons fait ces expériences de transmission. La transmission par insectes est un critère important d'identification des virus sévissant chez les Malvacées en particulier.

### 1 - Transmission par Pucerons

Dans les champs expérimentaux de Gombo ou dans les cultures villageoises, les feuilles de la plante sont très souvent parasitées par des Pucerons qui recouvrent presque totalement la surface inférieure des feuilles. Il s'est avéré qu'il s'agissait du Puceron du Cotonnier: *Aphis gossypii* Glov. (Aphididae, Homoptères). De nombreux virus des Malvacées sont transmis par Pucerons; il était donc intéressant de tenter la transmission du VMG par ces insectes.

Le Puceron est élevé sur *H. esculentus* sain en abris "insect-proof". Le temps minimum d'élevage est de 20 jours pour être sûr que le Puceron est indemne de virus. En effet la persistance d'un virus dans l'insecte ne dépasse pas 13 jours (Sylvester, 1967). A la fin de cette période, le Puceron

est mis à jeuner pendant 18 heures. Pour cela les feuilles où il se développe sont récoltées et déposées dans un tube noir dont une seule extrémité laisse passer la lumière. Ainsi les Pucerons se retrouvent concentrés à cette extrémité où il est aisé de les prélever. Le prélèvement est effectué avec la pointe d'un pinceau pour les transporter sur une feuille de Gombo assez jeune mais présentant de beaux symptômes de virose. 20 insectes par plante sont mis ainsi à se nourrir et l'on utilise 10 plantes par expérience. Le repas sur les plantes malades dure 2 heures. Puis on repère les Aphides qui se déplacent, c'est à dire ceux qui ne sont pas en train de se nourrir, afin de ne pas casser leur rostre en les enlevant et, on les prélève pour les déposer délicatement sur de jeunes feuilles de Gombo sain. La moitié des insectes est tué au bout de 24 heures par pulvérisation d'insecticide, l'autre moitié est laissée sur les plantes saines pendant 15 jours en abris "insect-proof" pour savoir si la transmission est persistante ou non.

## 2 - Transmission par Aleyrodes

On observe également très souvent des invasions d'Aleyrodes dans les cultures de Gombo. Il s'agit de *Bemisia tabaci* Genn. (Aleyrodidae, Homoptères), très connu des auteurs identifiant de nouveaux virus et en particulier des virus des Malvacées. Nous avons donc essayé la transmission du VMG par *Bemisia tabaci* dans les conditions suivantes.

Le temps de rétention d'un virus dans l'insecte est de 20 jours au maximum (Costa and Bennett, 1950; Flores and Silberschmidt, 1958; Cohen and Nitzany, 1966). Par conséquent, il est nécessaire d'élever les insectes pendant 25 jours; l'élevage est facile

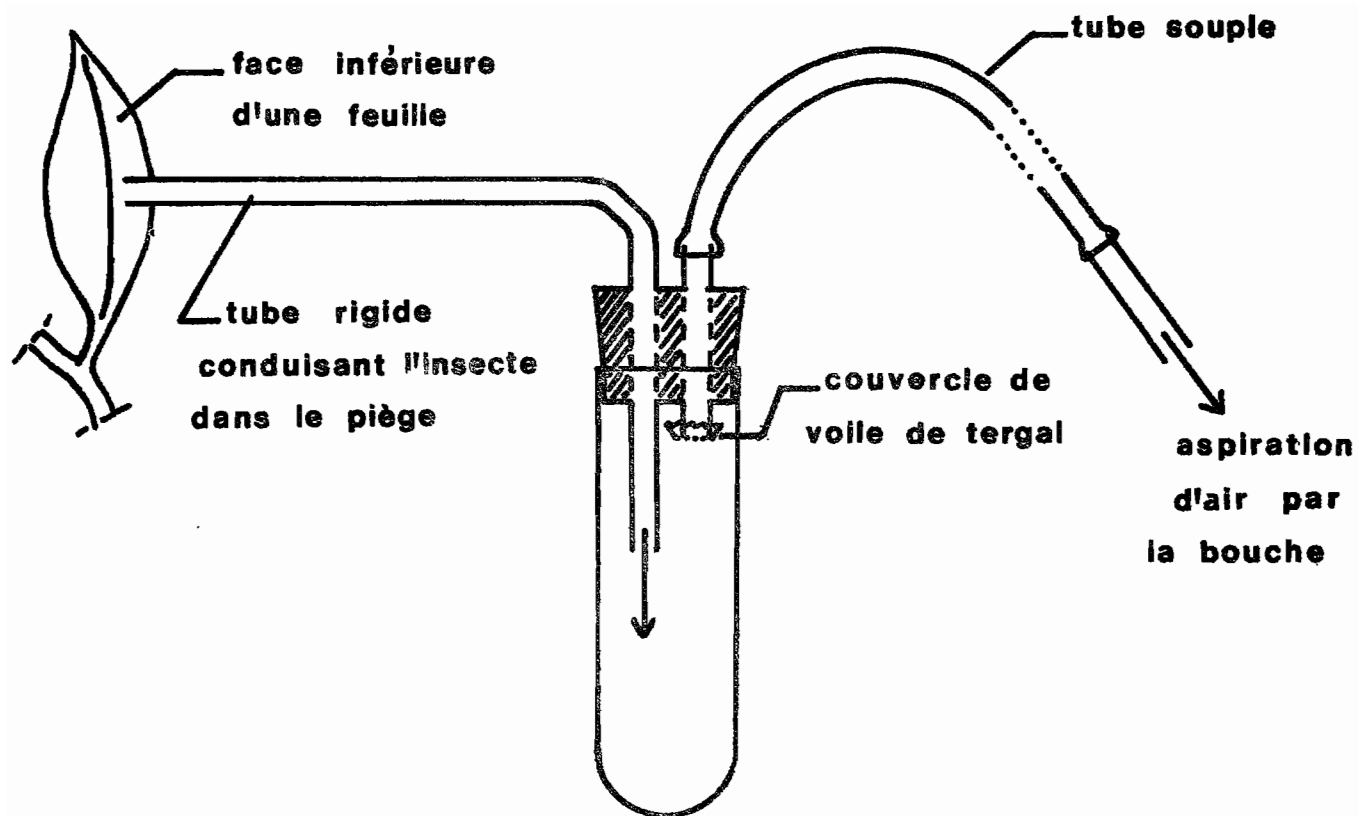


Figure 1. Piège à insectes.

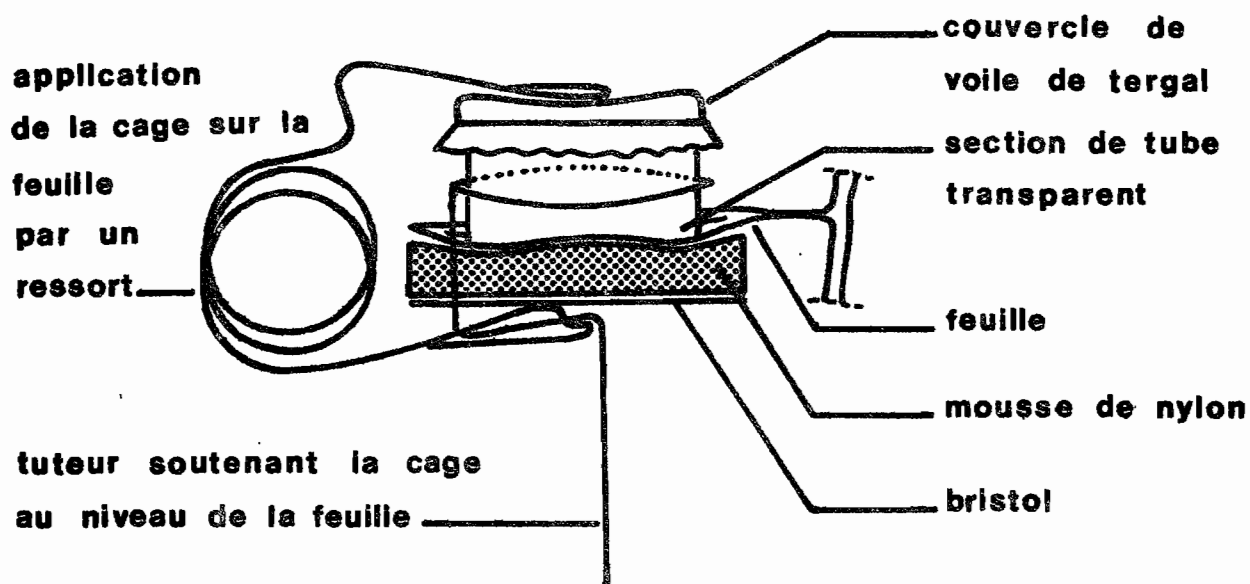


Figure 2. Cage de transmission. Echelle x1.

sur des plantes saines de *Nicotiana tabacum* var. Xanthi et Samsun en abris "insect-proof". A la fin de l'élevage, les Aleyrodes sont prélevés à la face inférieure des feuilles de Tabac à l'aide du piège décrit figure 1, à raison de 100 insectes par tube. Le tube est ensuite entreposé à 4°C pendant 10 minutes de manière à endormir les Aleyrodes, encore appelés Mouches Blanches. On profite de leur torpeur pour les transférer dans les cages de transmission décrites par Capoor et Varma en 1950 (fig. 2). Les cages sont immédiatement disposées sur les feuilles malades jeunes de Gombo. Le temps d'acquisition du virus par les Mouches Blanches est au maximum de 8 heures (Laird and Dickson, 1959). On les laisse donc se nourrir pendant 24 heures. Puis les cages sont transportées sur les plantes saines où elles restent au moins 30 heures, la période d'incubation du virus dans les Mouches Blanches étant de plus de 21 heures (Cohen and Nitzany, 1966); on est ainsi certain que le virus a bien pu pénétrer dans la plante. Une cage contenant 100 insectes est placée sur une plante; chaque essai comporte 15 plantes.

#### XI - TRANSMISSION PAR CUSCUTE

Cette transmission est aussi un critère d'identification des virus.

Nous avons fait le test à l'aide de *Cuscuta subinclusa* Dur. et Hilg. (Convolvulacées). Les graines sont mises à germer dans des boîtes de Pétri sur papier filtre humidifié, après avoir été traitées à l'acide sulfurique concentré pendant une heure. Quand la germination commence, les graines sont déposées sur les plantes virosées par le VMG à différents endroits (limbe,

aisselle des feuilles, pétiole). La plupart des graines continuent à se développer en parasitant la plante malade. Lorsque la Cuscuta a atteint un bon développement, ses tiges sont amenées en contact des plantes saines sensibles au virus. Elle parasite alors en même temps la plante malade et la plante saine et peut ainsi permettre la transmission du virus de l'une à l'autre.

## RESULTATS

### I - TRANSMISSIONS

#### 1 - Transmission mécanique

Toutes les transmissions mécaniques faites sur le Gombo à partir d'extraits bruts de Gombo ou d'extraits bruts d'autres plantes infectées par le VMG ont été positives avec un pourcentage élevé d'infection. Les transmissions qui sont rapportées dans le paragraphe II de ce chapitre ont été faites par inoculation mécanique.

#### 2 - Transmission par Pucerons

Nous avons fait quatre expériences de transmission par ces insectes; aucun symptôme n'a été observé sur les plantes inoculées. Quelques feuilles ont été prélevées au hasard et broyées. L'extrait brut obtenu a été inoculé à des Gombos sains mais ce contrôle est resté négatif.

On peut donc conclure que le VMG n'est pas transmissible par le Puceron *Aphis gossypii*.

#### 3 - Transmission par Aleyrodes

Deux expériences de transmission ont été réalisées avec ce vecteur. Le premier essai a été négatif mais, dans le cas du second, les symptômes typiques du VMG sont apparus sur deux plantes.

On considère que cette expérience est positive (communication personnelle de R. W. Fulton). Par conséquent *Bemisia tabaci* transmet le virus de la mosaïque du Gombo.

Il faut ajouter que ce résultat est confirmé par deux sortes d'observations; premièrement des observations faites dans les champs de culture de Gombo à la Station d'Expérimentation Agricole de Bouaké montrent que la virose apparaît 2 à 3 semaines après une invasion d'*Aleyrodes* et la pulvérisation régulière d'insecticide prévient la pullulation du vecteur et permet d'obtenir un pourcentage nettement moins élevé de pieds virosés; deuxièmement, dans les abris non "insect-proof" (moustiquaire seule) où les *Aleyrodes* se développent librement, on observe l'apparition spontanée de symptômes de VMG dans les lots sains de Gombo voisins des lots virosés.

#### 4 - Transmission par Cuscuta

La transmission à l'aide de ce parasite a été tentée sur différentes espèces de plantes hébergeant le VMG; le passage des tiges de *Cuscuta subinclusa* a été fait à partir des plantes malades sur des plantes saines des espèces suivantes: de *H. esculentus* à *H. esculentus*, de *Cucumis sativus* à *H. esculentus*, de *Chenopodium quinoa* à *H. esculentus*, de *Chenopodium quinoa* à *Chenopodium album* et de *Arachis hypogaea* à *H. esculentus*. Tous les essais ayant été négatifs, il est possible de conclure que *Cuscuta subinclusa* ne transmet pas le VMG.



## 5 - Transmission par graines

Une grande expérience de transmission par graines a été faite avec 158 plantes de Gombo issues de graines de Gombos virosés par le VMG. Ces plantes ont été conservées en abris "insect-proof" pendant deux mois. Aucun symptôme n'est apparu. Un prélèvement au hasard de feuilles apparemment saines a été broyé et inoculé à des Gombos sains. Ce contrôle est resté négatif. On peut donc conclure que le VMG n'est pas transmis par graines.

## II - RESULTAT DES INOCULATIONS MECANIKES A DES PLANTES APPARTENANT A PLUSIEURS FAMILLES

Un critère bien connu d'identification d'un virus est de déterminer quelles sont les plantes qui l'hébergent et les plantes qui ne lui sont pas sensibles.

Nous avons donc inoculé mécaniquement au stade cotylédonaire ou feuille primaire, un grand nombre d'espèces et de variétés (119) appartenant à différentes familles (12). Nous avons fait le choix des plantes hôtes tout d'abord dans la même famille que l'hôte naturel du virus, puis dans des familles connues pour héberger de nombreux virus (Chénopodiacées, Solanacées, Légumineuses, Cucurbitacées), ou dans des espèces cultivées chez lesquelles la virose peut avoir une incidence économique (Kénaf, Coton, "Cowpea"), ou bien dans des espèces permettant de rapprocher ou de différencier le VMG d'autres virus.

Toutes les transmissions positives ont été contrôlées en broyant les feuilles présentant des symptômes dans les conditions décrites au paragraphe III-1 de Matériels et Méthodes, et en ino-

TABLEAU 1

Résultats des inoculations mécaniques du VMG sur des plantes  
appartenant à différentes familles

Nom des plantes	Nombre de plantes inoculées	Nombre de plantes infectées	Persistance des symptômes
<b>Amaranthacées</b>			
<i>Amaranthus caudatus</i>	88	0	
<i>Amaranthus spinosus</i>	60	0	
<i>Gomphrena celosioïdes</i>	18	15	+
<i>Gomphrena globosa</i>	15	13	+
<b>Chénopodiacées</b>			
<i>Beta vulgaris</i>	8	0	
<i>Chenopodium album</i>	39	17	+
<i>Chenopodium amaranticolor</i>	30	30	+
<i>Chenopodium ambrosioïdes</i>	29	29	+
<i>Chenopodium botrys</i>	27	27	+
<i>Chenopodium ficifolium</i>	32	10	+
<i>Chenopodium foetidum</i>	37	36	+
<i>Chenopodium hybridum</i>	10	7	+
<i>Chenopodium multifidum</i>	3	3	+
<i>Chenopodium polyspermum</i>	34	14	+
<i>Chenopodium quinoa</i>	20	19	+
<i>Chenopodium rubrum</i>	20	10	+
<i>Kochia scoparia</i>	19	4	+
<i>Spinacia oleracea</i>	60	37	+
<b>Composacées</b>			
<i>Calendula officinalis</i>	30	0	
<i>Zinnia elegans</i>	15	0	
<b>Convolvulacées</b>			
<i>Calystegia sepium</i>	10	2	+
<i>Convolvulus elongatus</i>	32	15	+
<i>Convolvulus pentapetaloides</i>	23	3	+
<i>Convolvulus sicularis</i>	10	6	+
<i>Ipomea purpurea</i> var. <i>caerulea</i>	10	5	+
<i>Pharbitis purpurea</i>	15	7	+
<b>Crucifères</b>			
<i>Brassica oleracea</i>	20	0	
<b>Cucurbitacées</b>			
<i>Bryonia dioica</i>	7	2	+
<i>Citrullus colocynthis</i>	4	2	+
<i>Citrullus lanatus</i> v. <i>citroides</i>	14	0	
<i>Cucumis melo</i> ssp. <i>agrestis</i>	14	0	

TABLEAU 1 (suite)

Nom des plantes	Nombre de plantes inoculées	Nombre de plantes infectées	Persistance des symptômes
<i>Cucumis sativus</i> var. blanc très gros de Bonneuil	25	25	+
<i>Cucurbita ficifolia</i>	10	0	
<i>Cucurbita maxima</i>	6	0	
<i>Cucurbita mixta</i>	12	0	
<i>Cucurbita pepo</i> v. <i>pyriformis</i>	17	0	
<i>Luffa aegyptiaca</i>	17	0	
<b>Euphorbiacées</b>			
<i>Euphorbia dentata</i>	15	14	+
<i>Euphorbia foliata</i>	22	26	+
<i>Euphorbia lathyris</i>	22	6	+
<i>Euphorbia martini</i>	20	0	
<i>Euphorbia myrsinites</i>	3	0	
<i>Euphorbia terracina</i>	30	15	+
<i>Euphorbia wulfenii</i>	24	0	
<i>Manihot flabellifolia</i>	11	0	
<i>Ricinus communis</i> c.v. <i>sanguineus</i>	3	0	
<b>Légumineuses</b>			
<i>Arachis hypogaea</i>	24	20	+
<i>Glycine max</i> var. 227 CNS	7	0	
<i>Mucuna pruriens</i>	14	0	
<i>Phaseolus lathyroides</i>	10	0	
<i>Phaseolus vulgaris</i> var. bountiful	34	0	
var. bush bean Bupee's strugless green pod	35	0	
var. prince	29	0	
var. flageolet rouge	6	0	
var. triomphe de Farcy	5	0	
<i>Pisum sativum</i> var. hybride INRA 257	21	0	
<i>Vicia faba</i>	9	0	
<i>Vigna sinensis</i>	60	30	+
<b>Malvacées</b>			
<i>Abutilon arboreum</i>	12	10	-
<i>Abutilon avicennae</i>	27	24	-
<i>Abutilon indicum</i>	6	5	-
<i>Abutilon molle</i> sweet	24	23	-
<i>Althea rosea</i>	20	3	-
<i>Althea sinensis</i>	22	3	-
<i>Gossypium arboreum</i>	20	20	-
<i>Gossypium barbadense</i>	20	15	-
<i>Gossypium hirsutum</i>	25	25	-
<i>Hibiscus asper</i>	15	15	-
<i>Hibiscus cannabinus</i>	18	18	-
<i>Hibiscus esculentus</i>	20	20	-
<i>Hibiscus gossypinus</i>	24	23	-
<i>Hibiscus manihot</i>	11	10	-

TABLEAU 1 (fin)

Nom des plantes	Nombre de plantes inoculées	Nombre de plantes infectées	Persistance des symptômes
Hibiscus micranthus	9	7	-
Hibiscus moscheutos	2	2	-
Hibiscus pedunculata	3	3	-
Hibiscus sabdariffa	10	10	-
Hibiscus syriacus	3	2	-
Hibiscus trionum	12	12	-
Lavatera cretica	16	4	-
Lavatera thuringiaca	10	10	-
Lavatera trimestris	24	21	-
Malope trifida	17	17	-
Malva alcea	20	19	-
Malva crispa	30	25	-
Malva moschata	24	24	-
Malva neglecta	21	11	-
Malva pusilla	19	19	-
Malva rotundifolia	12	10	-
Malva sylvestris	13	9	-
Malva verticillata	21	11	-
Malvastrum coromandelianum	6	6	-
Sida cordifolia	7	4	-
Sida rhombifolia	41	4	-
Sida stipulata	12	7	-
Sida urens	8	5	-
Thespesia populnea	2	1	-
Urena lobata	5	3	-
Wissadula cretica	16	4	-
Polygonacées			
Polygonum persicaria	3	0	
Rumex alpinus	18	0	
Rumex arifolium	2	0	
Rumex crispus	19	0	
Rumex scutatus	12	0	
Solanacées			
Atropa belladonna	15	0	
Capsicum annuum	20	0	
Capsicum frutescens	4	0	
Datura Metel	4	0	
Datura stramonium	17	0	
Lycopersicon esculentum	20	0	
Nicotiana clevelandii	18	18	+
Nicotiana glutinosa	18	0	
Nicotiana tabacum var. Samsun	12	0	
Nicotiana tabacum var. White Burley	10	0	
Nicotiana tabacum var. Xanthi	25	0	
Petunia hybrida	20	0	
Physalis floridana	12	0	
Solanum melongenum	12	0	
Solanum nigrum	20	20	+
Urticacées			
Urtica dioica	10	4	

culant les extraits bruts obtenus à des jeunes Gombos sains.

Les plantes ne montrant pas de symptôme n'ont pas été contrôlées (excepté les Tabacs) ce qui permet de dire qu'il y a peut-être dans la liste des plantes que nous présentons, des hôtes apparemment sains mais chez lesquels le développement du virus a pu avoir lieu: l'absence de symptôme pouvant être dû au développement de la plante à des températures élevées (phénomène bien connu).

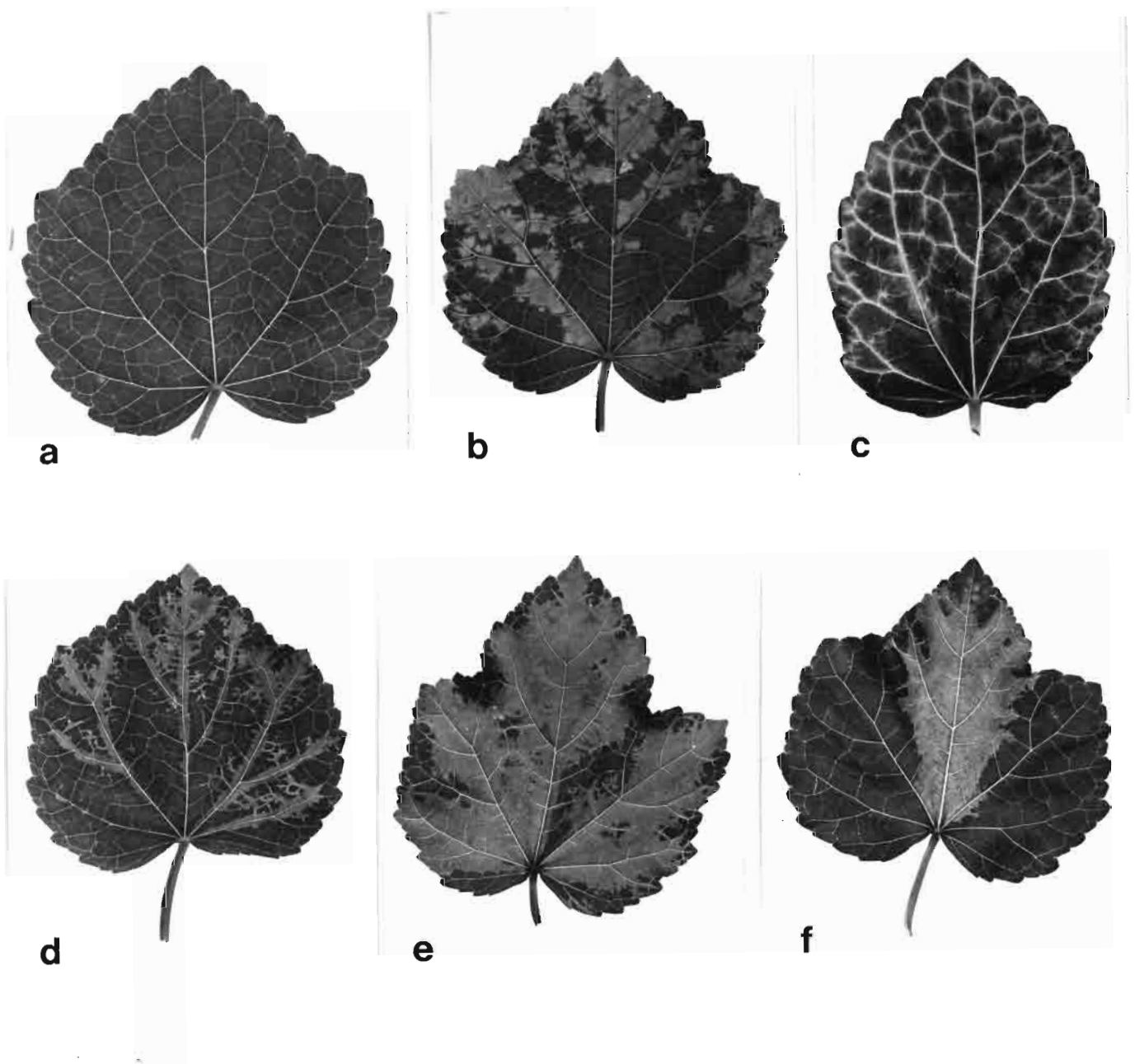
Les résultats de ces inoculations sont donnés dans le tableau 1.

La lecture de ce tableau appelle quelques commentaires: on constate rapidement que le VMG est transmissible à toutes les Malvacées qui ont été inoculées, en particulier au Coton et au Kénaf, et à de nombreuses Chénopodiacées. Par contre, il est intéressant de noter que les Légumineuses et les Solanacées résistent dans l'ensemble à l'infection par le VMG mais que *Vigna sinensis* ("Cowpea") et *Arachis hypogaea* (Arachide) dans le premier cas et *Solanum nigrum* et *Nicotiana clevelandii* dans le deuxième cas sont des hôtes très sensibles. Chez les Amaranthacées, les Convolvulacées, les Cucurbitacées et les Euphorbiacées, quelques espèces sont sensibles. Mais chez les Composées, Crucifères et Polygonacées, le VMG ne semble pas pouvoir se reproduire.

En conclusion, le VMG est un virus qui se reproduit aisément chez un grand nombre de plantes.

### III - SYMPTOMATOLOGIE

La première remarque qui vient à l'esprit en observant les symptômes du VMG sur l'ensemble des plantes qu'il infecte est



**Figure 3.** Symptômes systémiques provoqués par l'inoculation mécanique du VMG sur *H. esculentus* var. Clemson Spineless:

- a - Feuille saine.
- b - Feuille primaire montrant la mosaïque.
- c - Feuille primaire montrant le "vein clearing".
- d et e - Feuilles secondaires montrant le "vein banding".
- f - Feuille tertiaire montrant le "vein banding" réduit à une seule nervure.

(Photographies G. Petiot, ORSTOM)

qu'ils sont très variés. Ce sont des chloroses plus ou moins importantes aux dessins particuliers, accompagnées d'une croissance plus ou moins retardée de la plante.

Les auteurs ayant écrit une symptomatologie emploient les mêmes termes pour des symptômes différents quand on compare les photographies qu'ils présentent. Afin qu'il n'y ait pas d'ambiguïté, nous avons basé la description des symptômes du VMG sur la terminologie employée par Bos dans le petit ouvrage qu'il a écrit à ce sujet en 1964.

#### 1 - Symptômes chez les Malvacées

L'ensemble des symptômes chez les Malvacées se manifeste sur une, deux ou trois feuilles puis disparaît.

##### a - Symptômes chez H. esculentus

Dans le cas de la variété "court" (variété africaine), quand la plante est inoculée au stade cotylédonaire, les symptômes font une courte apparition sur la feuille primaire puis les feuilles suivantes ne présentent pas de symptômes. Dans le cas de la variété "Clemson Spineless" (variété américaine). les symptômes apparaissent sur la feuille primaire, secondaire et tertiaire. La première feuille présente une mosaïque de tâches irrégulières vert pâle délimitées par les nervures (figure 3b) ou un éclaircissement des nervures (figure 3c). Quelque fois cette feuille déploie une mosaïque de tâches vert clair, vert foncé et blanches. La deuxième feuille présente généralement de plus ou

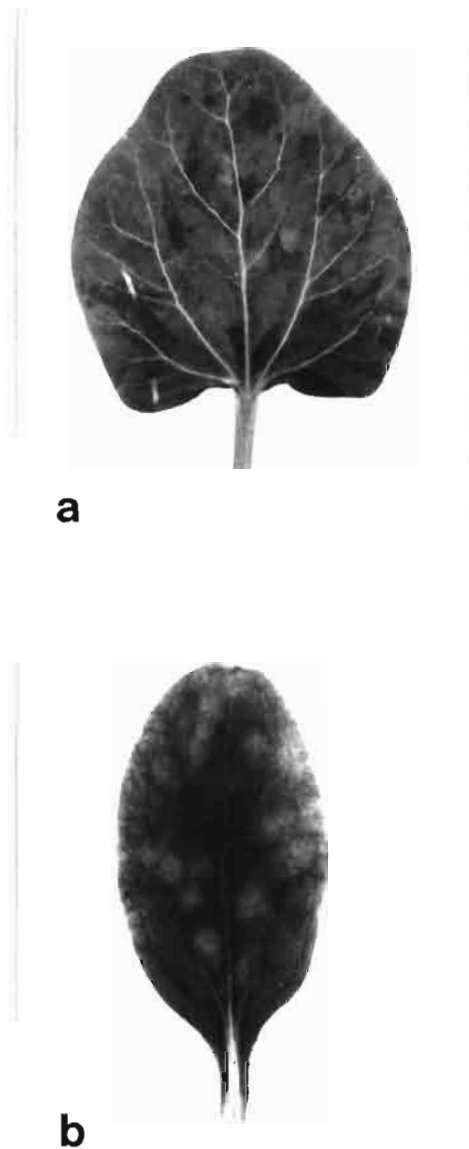


Figure 4. Symptômes locaux provoqués par le VMG sur des  
feuilles cotylédonaires inoculées mécaniquement.  
a - Mosaïque sur cotylédon de *H. esculentus*.  
b - Lésions locales chlorotiques sur cotylédon de *Cucumis*  
*sativus*.  
(Photographies G. Petiot, ORSTOM)



moins larges bandes vert pâle irrégulières bordant les nervures principales (figure 3d et figure 3e) que Bos qualifierait de "vein banding". La troisième feuille montre les mêmes bandes mais le long d'une seule nervure principale (figure 3f). Généralement les symptômes ne se manifestent pas sur les feuilles suivantes mais réapparaissent sur les feuilles développées six semaines après l'inoculation.

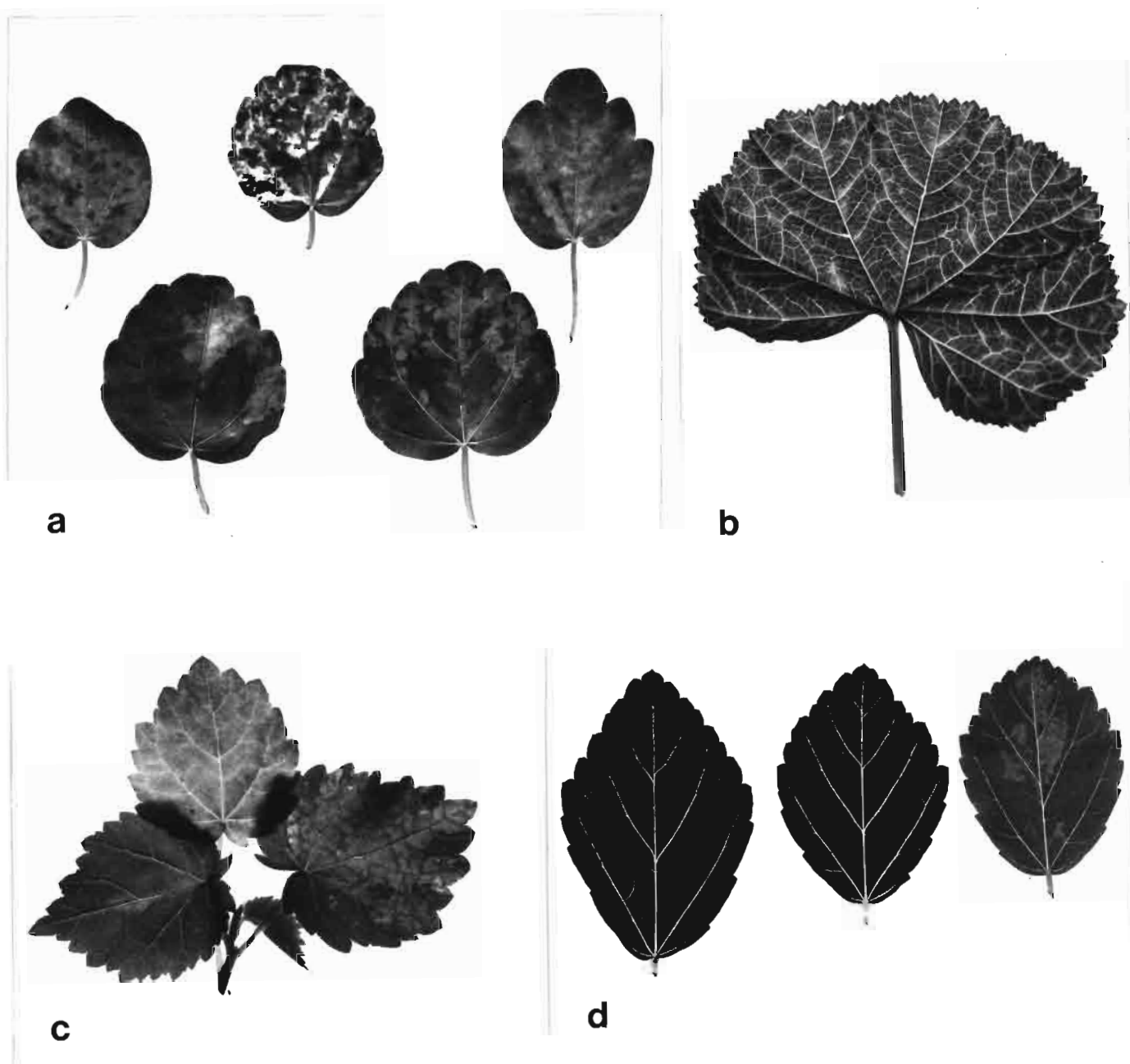
De temps en temps un symptôme local du type mosaïque apparaît sur les cotylédons inoculés (figure 4a).

#### b - Le genre Hibiscus

Des symptômes du même type que *H. esculentus*: mosaïque et éclaircissement des nervures ("vein clearing"), bandes vert pâle irrégulières le long des nervures principales ("vein banding") (figure 5a), ont été obtenues chez les dix autres espèces d'*Hibiscus* inoculées avec le VMG. Il faut noter que *H. sabdariffa* a présenté une mosaïque vert pâle, vert foncé et jaune.

#### c - Le genre Gossypium

Dans le genre *Gossypium* le symptôme principal est une mosaïque constituée d'un mélange de tâches vert pâle irrégulières délimitées par les nervures et de bandes chlorotiques très fines bordant les petites nervures, ce dernier symptôme étant réparti irrégulièrement sur le limbe.



**Figure 5.** Symptômes développés chez quelques Malvacées après inoculation mécanique par le VMG:

a - Symptômes de mosaïque et de "vein banding" sur des feuilles de *H. gossypinus*.

b - Feuille virosée de *Malva parviflora*.

c - Symptômes chez *Abutilon arboreum*.

d - Feuilles virosées de *Sida stipulata*.

(Photographies G. Petiot, ORSTOM)

#### d - Les autres Malvacées

Le genre *Sida* est caractérisé par une mosaïque grossière et des bandes irrégulières le long des nervures principales (figure 5d).

Le genre *Malva* développe des tâches vert pâle irrégulières ou un "vein clearing" (figure 5b).

Le genre *Lavatera* présente des bandes réparties irrégulièrement et assez fines (0,5 mm de largeur) le long des nervures.

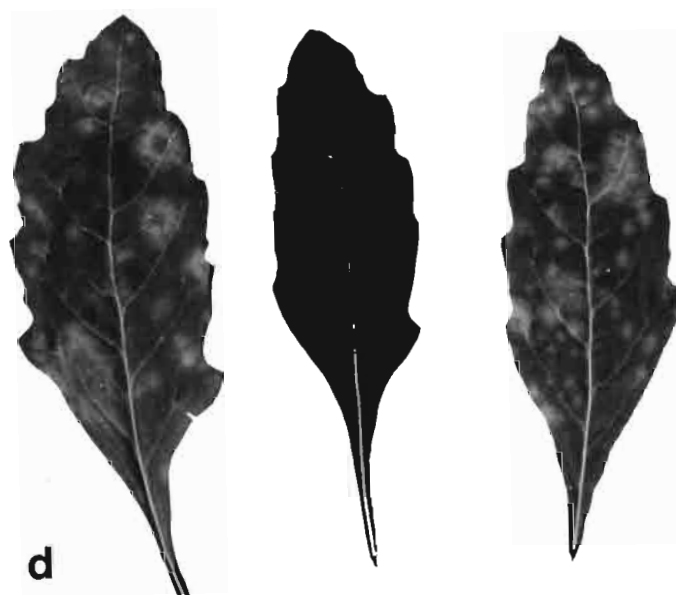
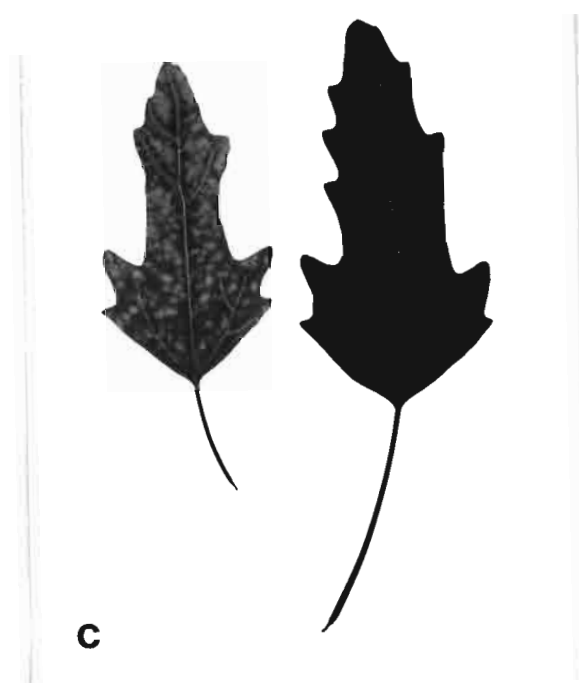
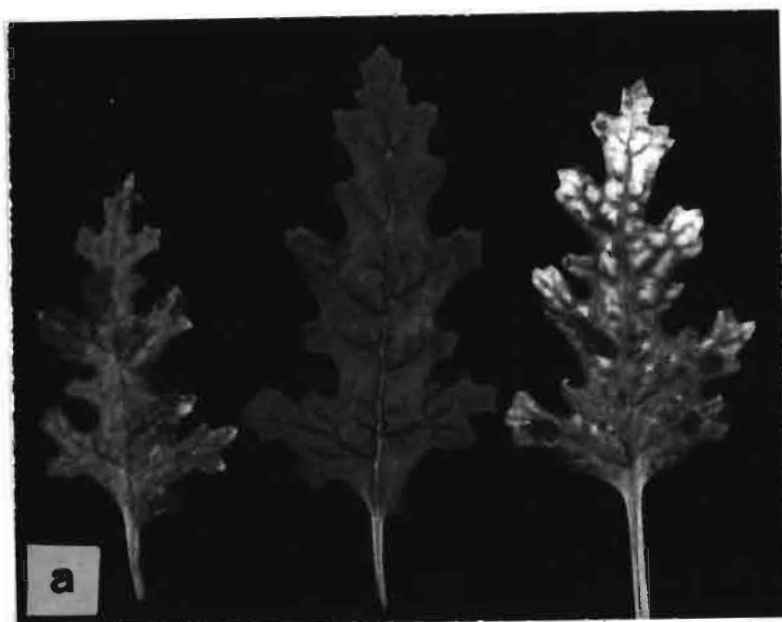
Le genre *Abutilon* montre des tâches vert clair assez grosses ou un "vein banding" (figure 5c).

Chez les plantes des autres familles, les symptômes persistent.

#### 2 - Symptômes chez les Chénopodiacées

Chez *Spinacia oleracea*, le limbe présente des tâches hétérogènes et des anneaux vert foncé ("ringspotting") (figure 6b).

Dans le genre *Chenopodium* on voit soit de nombreuses petites tâches homogènes régulièrement réparties sur le limbe ("spotting" ou "dotting") (figure 6c et figure 6d), soit des bandes très irrégulières suivant les nervures mais détachées de celles-ci qui émettent de temps en temps des prolongement, formant le symptôme que Bos appellerait "line pattern". Enfin un symptôme très répandu est un dessin formé par l'anastomose des tâches chlorotiques vert pâle, vert foncé ou blanches et qui suit plus ou moins les nervures principales et rappelle le symptôme du "vein



**Figure 6.** Symptômes chez quatre espèces de Chénopodiacées inoculées mécaniquement par le VMG:

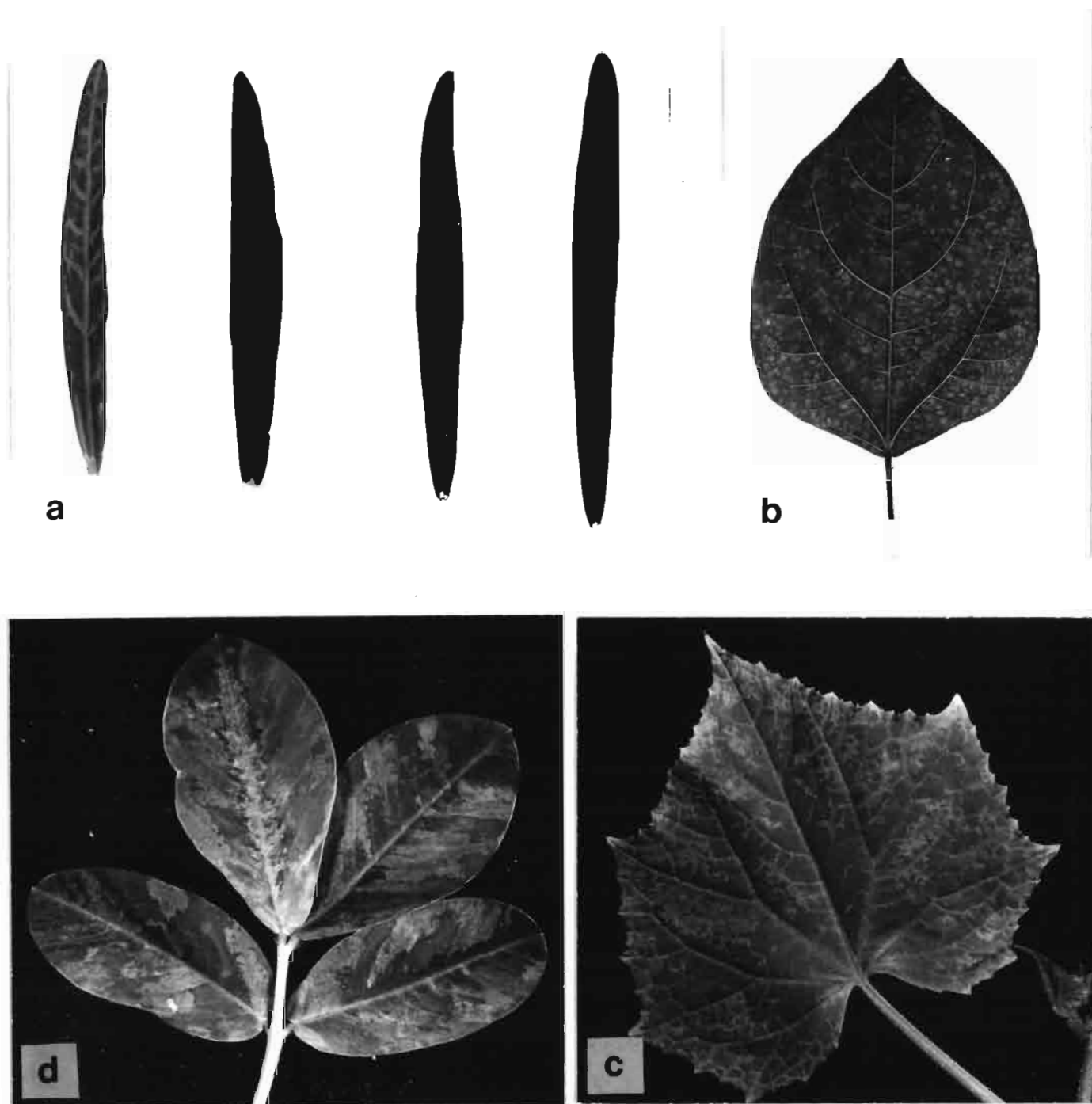
a - Mosaïque et "vein banding" sur *Chenopodium botrys*.

b - Une feuille virosée de *Spinacia oleracea*.

c - Feuilles saines et virosées de *Chenopodium ficifolium*.

d - Feuilles de *Chenopodium ambrosioides*.

(Photographies G. Petiot, ORSTOM)



**Figure 7.** Symptômes provoqués par l'inoculation mécanique du VMG sur des plantes appartenant aux familles des Euphorbiacées, Légumineuses et Cucurbitacées.

- a - *Euphorbia lathyris*.
- b - Un foliole de *Vigna sinensis*.
- c - *Cucumis sativus*.
- d - *Arachis hypogaea*.

(Photographies G. Petiot et L. Givord, ORSTOM)

banding" (Ch. botrys, Ch. ambrosioides, Ch. foetidum) (figure 6a et figure 6d). On peut également observer chez ce genre, un "ring-spotting" qui accompagne le "spotting" lorsque les tâches qui constituent ce dernier ne sont pas très nombreuses (Ch. ambrosioides) (figure 6d). Il faut remarquer, en plus de ces symptômes systémiques très particuliers, l'apparition trois ou quatre jours après inoculation, chez certaines espèces de Chenopodium, de lésions locales chlorotiques (Ch. foetidum et Ch. ambrosioides) qui malheureusement se sont avérées inutilisables pour l'étude du pouvoir pathogène du VMG.

### 3 - Symptômes chez les Légumineuses

Sur les feuilles d'*Arachis hypogaea* (figure 7d) on peut observer une mosaïque très caractéristique au dessin compliqué de surfaces hétérogènes aux nombreuses nuances allant du vert pâle presque blanc au vert foncé.

Chez *Vigna sinensis*, les petites nervures du limbe sont bordées très finement de vert clair ça et là (figure 7b).

### 4 - Symptômes chez les Cucurbitacées

Nous ne décrivons que *Cucumis sativus* qui montre un symptôme systémique tout à fait analogue à celui de *Vigna sinensis* (figure 7c). Quinze jours après inoculation, des lésions locales chlorotiques apparaissent sur les cotylédons (figure 4b); ce temps d'apparition des lésions peut être raccourci à 7 jours si l'on étête la plante pour empêcher le développement des feuilles et donc des symptômes systémiques. Nous étudions actuellement la



**Figure 8.** Symptômes provoqués par le VMG sur une Solanacée:  
*Nicotiana clevelandii*.

a - Plantes entières saine et virosée.

b - Feuilles saine et virosées.

(Photographies G. Petiot, ORSTOM)

possibilité d'utiliser *Cucumis sativus* pour évaluer le pouvoir pathogène du VMG.

#### 5 - Symptômes chez les Solanacées

*Nicotiana clevelandii*, le seul Tabac sensible au VMG, présente une mosaïque caractéristique de tâches chlorotiques vert pâle et vert foncé (figure 8b) et un nanisme important (figure 8a).

*Solanum nigrum* est très atteint aussi dans sa croissance et le limbe montre un "vein banding" irrégulier.

#### 6 - Symptômes chez les Euphorbiacées

Des bandes chlorotiques assez fines bordant les nervures principales, des tâches petites et homogènes ou de tailles différentes suivant les espèces, sont les symptômes uniques; parfois ces symptômes sont associés au "vein banding". (figure 7a).

### IV - PROPRIETES BIOLOGIQUES

En ce qui concerne les propriétés biologiques de ce virus, rien n'est encore connu. Nous avons étudié systématiquement les propriétés de l'extrait brut en testant l'expression du pouvoir pathogène, son point de dilution limite, sa durée de conservation à température ambiante dans la feuille virosée et dans l'extrait brut, son comportement dans l'extrait brut traité par la chaleur ou subissant des congélations-décongélations répétées.

Les résultats de ces différentes expériences nous ont donnés de précieux renseignements sur les propriétés biologiques



**T A B L E A U 2**

**Apparition des Symptômes de VMG sur *R. esculentus* au cours du temps et en fonction de la dilution.<sup>a</sup>  
Calcul de l'Indice de Pouvoir Pathogène.**

Dilution	Infection					Somme <sup>c</sup>	Multiplicateur <sup>d</sup>	Produits <sup>e</sup>
	Jours après inoculation							
	6	7	8	9	10			
10 <sup>-1</sup>	1/5 <sup>b</sup>	4/5	5/5	5/5	5/5	20	1	20
10 <sup>-2</sup>	1/5	4/5	5/5	5/5	5/5	20	2	40
10 <sup>-3</sup>	1/5	3/5	5/5	5/5	5/5	19	3	57
10 <sup>-4</sup>	0/5	2/5	3/5	3/5	3/5	10	4	40
10 <sup>-5</sup>	0/5	0/5	1/5	1/5	2/5	4	5	20
10 <sup>-6</sup>	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0	6	0
Total des Produits = Indice de Pouvoir Pathogène =								177

**a : Résultats obtenus avec un extrait brut préparé selon la méthode décrite dans le paragraphe III.1 de Matériels et Méthodes à partir de feuilles récoltées 7 jours après inoculation.**

**b : Nombre de plantes avec Symptômes/nombre de plantes inoculées.**

**c : Somme de toutes les plantes montrant des symptômes à toutes les dates d'observation pour chaque dilution.**

**d : Logarithme négatif de la dilution**

**e : Somme x multiplicateur pour chaque dilution.**

du virus et en conséquence constituent une base de travail pour la suite de l'étude du VMG; d'autre part, ces données sont des critères d'identification du virus qui permettent de le comparer aux virus déjà décrits.

#### 1 - Evaluation du pouvoir pathogène des préparations de VMG par la méthode de Raymer et Diener

La préparation à tester est diluée en série de  $10^{-1}$  à  $10^{-8}$  et chaque dilution est inoculée à 5 Gombos au stade feuille primaire ou secondaire. Puis l'on observe l'apparition des symptômes au cours du temps: le nombre des plantes infectées est noté le sixième, septième, huitième, neuvième et dixième jour après l'inoculation. Plus le virus est concentré, plus vite apparaissent les symptômes; en conséquence le point de dilution limite, le nombre des plantes infectées et le temps d'apparition des symptômes sont fonction de la concentration de l'inoculum. Un tableau est dressé avec ces données (tableau 2) et l'indice de pouvoir pathogène est calculé en multipliant le nombre total des plantes infectées pour chaque dilution par le logarithme négatif de la dilution et en additionnant ces produits pour toutes les dilutions.

#### 2 - Point de dilution limite

Cette technique donne une approximation de la concentration du virus dans la plante.

De cinq à dix jours après l'inoculation, des symptômes peuvent être observés sur les plantes inoculées avec les dilutions de  $10^{-1}$  à  $10^{-6}$ . Aucune infection n'a été obtenue à partir des di-

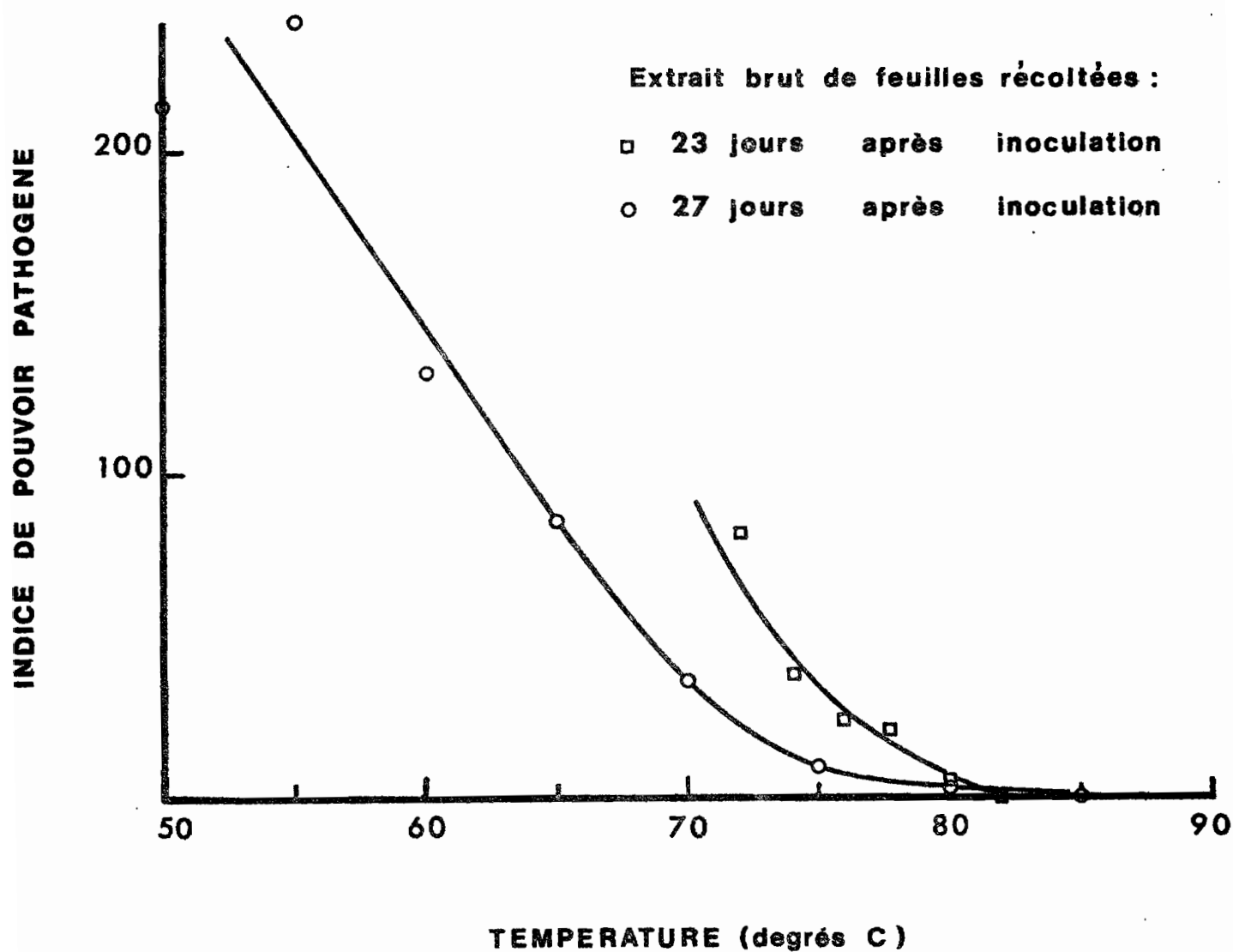


Figure 9. Thermoinactivation de l'extrait brut du VMG. Les conditions expérimentales sont les mêmes pour les deux lots de plantes.

lutions supérieures.

### 3 - Point de thermoinactivation

La figure 9 montre l'évolution du pouvoir pathogène du VMG en fonction de la température de chauffage de l'extrait brut de Gombo. Si l'on compare les indices de pouvoir pathogène obtenus après le traitement à différentes températures, les résultats suivant sont donnés: l'extrait brut traité à 50°C a un pouvoir pathogène égal à celui de l'extrait brut non traité; l'extrait brut chauffé à 72°C a perdu 66% de son pouvoir pathogène initial; à 78°C le pouvoir pathogène du VMG est réduit à 8% du pouvoir initial et à 80°C il ne reste plus que 1,6% du pouvoir pathogène de départ; à 82°C l'extrait brut n'est plus infectieux. Le VMG ne résiste donc pas au chauffage pendant 10 minutes à température supérieure à 80°C.

Son point de thermoinactivation est donc 80°C.

### 4 - Longévité in vitro

Les préparations d'extrait brut sont souvent contaminées par des bactéries, aussi réalise-t-on généralement ces expériences en tubes stérilisés et en additionnant aux préparations une goutte de chloroforme. Or dans la littérature concernant les virus des Malvacées et leur longévité in vitro, il ne semble pas que les auteurs utilisent de produit bactériostatique. Donc nous avons réalisé ces expériences sans aucune addition. Nous avons d'ailleurs observé assez souvent un développement bactérien.

Après 7 à 9 jours de conservation à température ambiante

le pouvoir pathogène de l'extrait brut du VMG diminue considérablement et a perdu toute activité après 10 jours.

Par conséquent la longévité in vitro de l'extrait brut de VMG est de 9 jours maximum.

#### 5 - Résistance à la dessiccation

L'extrait brut obtenu à partir des feuilles malades de Gombo desséchées n'est plus infectieux au delà de 76 jours d'exposition à l'air ambiant. Le pouvoir pathogène du virus était testé chaque semaine sur 10 plantes saines de Gombo seulement. Il serait donc intéressant de refaire cette expérience en testant le pouvoir pathogène par le test de Raymer et Diener.

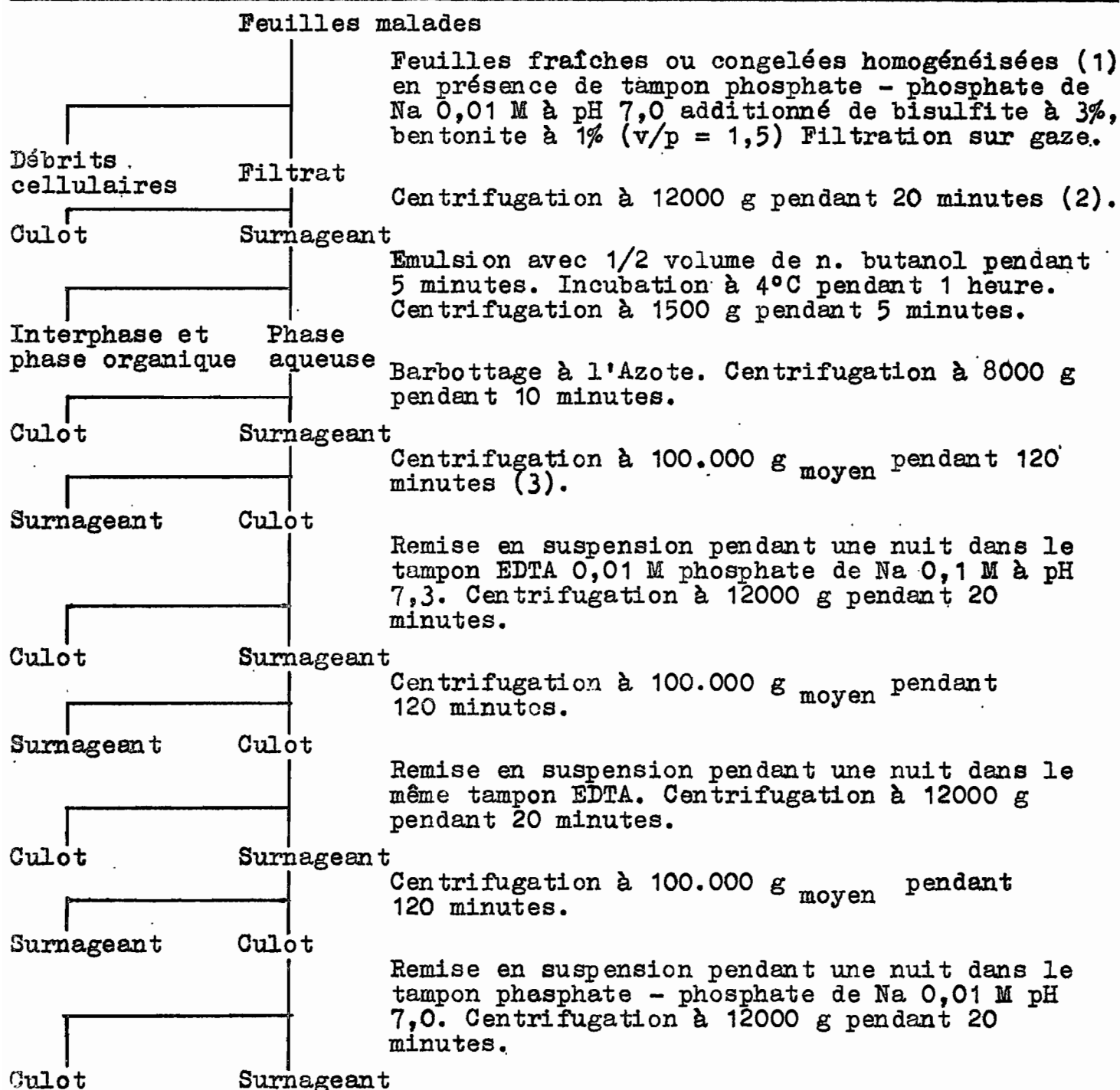
#### 6 - Résistance à la congélation-décongélation répétée

Un problème important en virologie est celui de la conservation du matériel viral. Nous avons fait l'étude de la résistance du pouvoir pathogène du VMG à la congélation-décongélation répétée.

Nous avons stocké 28 tubes à hémolyse en Pyrex dans lesquels se trouvait un broyat non filtré de feuilles de Gombo virosé, préparé selon la technique décrite dans le paragraphe III-1 de Matériels et Méthodes, à -20°C (2 ml de broyat dans chaque tube). Après 3 jours, l'ensemble des tubes est mis à décongeler pendant 2 heures et demie puis le contenu d'un tube est inoculé et les autres tubes remis à congeler. Cette opération est répétée autant de fois qu'il y a de tubes. Le dernier tube, décongelé 28 fois, contient un broyat encore infectieux. Une seule expérience de ce type a été faite; il serait évidemment très intéressant de la refaire

TABLEAU 3.

Technique de Purification



(1): Homogénéiseur Waring Blendor

(2): "Automatic superspeed refrigerated centrifuge Sorvall RC2-B "

(3): "Model L preparative ultracentrifuge Beckman"

à partir d'une suspension de virus purifié et en testant le pouvoir pathogène de chaque préparation à l'aide du test de Raymer et Diener.

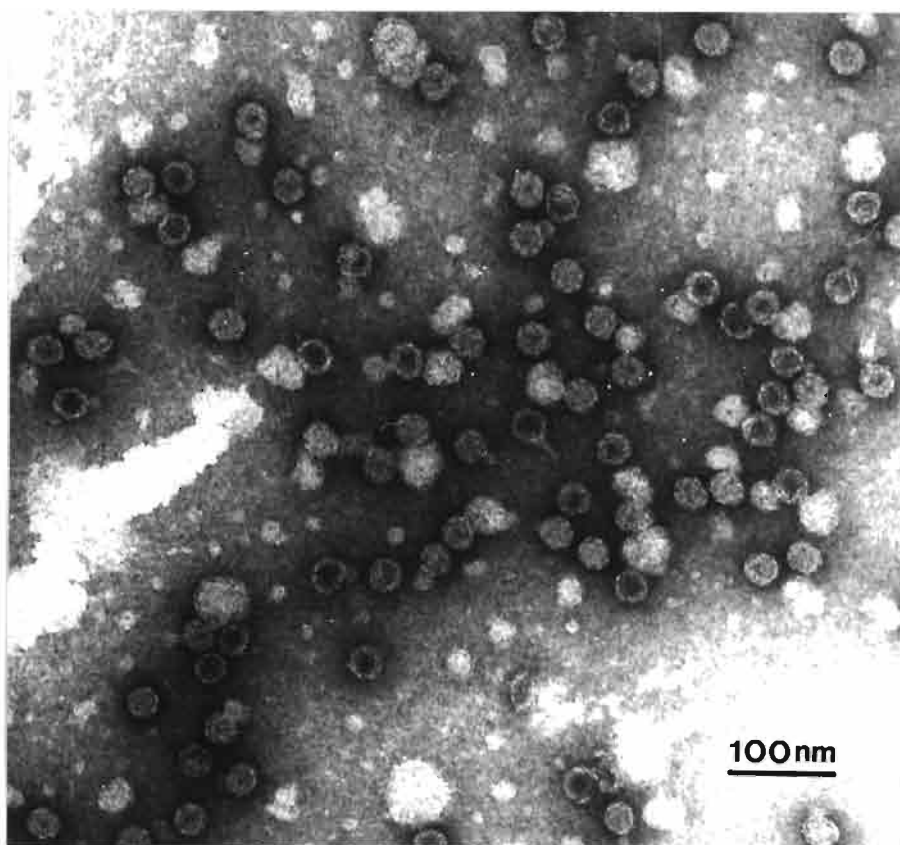
## V - TECHNIQUE D'EXTRACTION DU VIRUS

Rien n'est connu quant à la purification du VMG aussi avons nous essayé de nombreuses techniques avant d'en obtenir une satisfaisante: action de la chaleur, action du polyéthylène glycol 6000, solvants organiques et centrifugation différentielle, en présence de différents réducteurs et de différents tampons. La technique donnant les meilleurs résultats (haut pouvoir pathogène, concentration élevée et suspension finale incolore) est décrite dans le tableau 3. La manipulation est conduite à 0°C (bain de glace) à l'exception des agitations réalisées en chambre froide à -4°C. Généralement l'extraction est faite à partir de 200 g de feuilles et le culot de dernière centrifugation est remis en suspension dans du tampon PNa. Dans ces conditions on obtient 2 ml d'une suspension de VMG de densité optique de 300 unités mesurée à 260 nm. Plusieurs extractions ont été tentées selon le même schéma à partir de feuilles saines de Gombo; toutes ont été négatives; à la deuxième ultracentrifugation, on obtient un culot très petit dont la suspension analysée au spectrophotomètre n'absorbe aucunement.

## VI - ETUDE DE QUELQUES PROPRIETES PHYSICO-CHIMIQUES

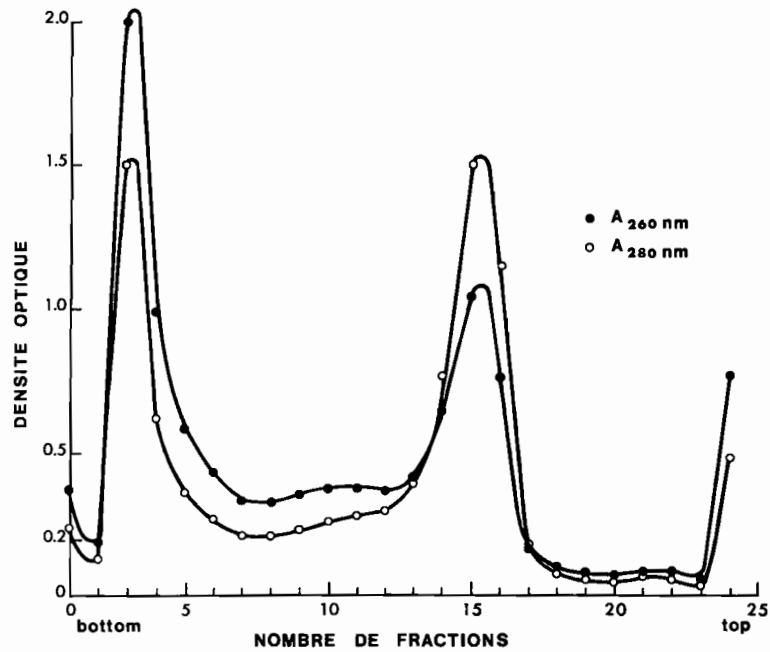
### 1 - Microscopie électronique

Les photographies réalisées au microscope électronique

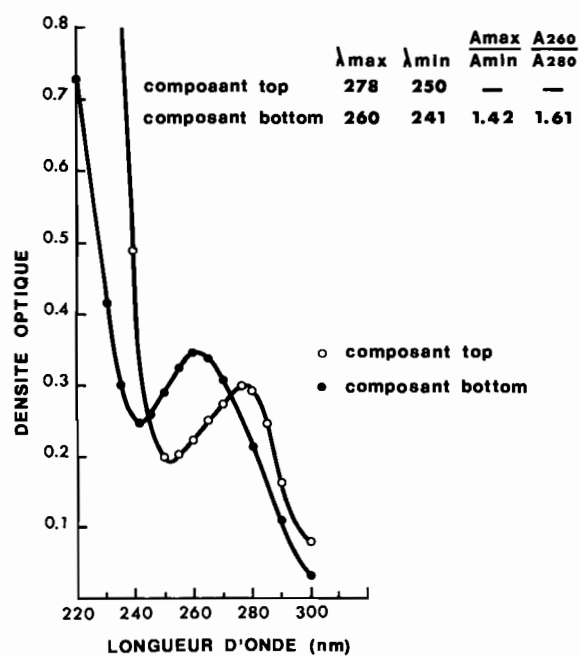


**Figure 10.** Aspect en microscopie électronique de quelques particules de VMG: virions et capsides. Suspension purifiée (tableau 3) dialysée au préalable contre du tampon acétate de sodium 0,05 M à pH 5,8. Coloration négative à l'acétate d'uranyle à 1%, EDTA 0,5% à pH 7,0. Diamètre des particules  $28,5 \pm 2,5$  nm. Grandissement 40 000.





**Figure 11.** Profil de densité optique mesurée à 260 et 280 nm du VMG sédimenté pendant 18 heures à 175 000  $g_{max}$  dans un gradient de chlorure de césium à 44% en tampon PNa. 0,5 ml de suspension virale purifiée (densité optique à 260 nm 20 unités) est chargé sur le gradient.



**Figure 12.** Spectre d'absorption en lumière ultraviolette du "top" et du "bottom" de VMG séparés par ultracentrifugation en gradient de chlorure de césium (figure 11).

(figure 10) montrent des particules icosaédriques de diamètre  $28,5 \pm 2,5$  nm. On remarque immédiatement la présence d'un certain nombre de capsides vides. L'aspect du virus complet évoque le "broad bean mottle virus" d'après J.T. Finch (communication personnelle), tandis que les capsides vides se rapprochent davantage de celui du "turnip yellow mosaic virus" (J. Witz). Les photographies prises à partir de fractions de gradient montrent que les capsides vides qui constituent la fraction légère ("top") et le virus complet (fraction lourde ou "bottom") sont bien séparés.

## 2 - Ultracentrifugation en gradient

La technique du gradient de saccharose démontre qu'il existe bien deux composants du VMG, mais ne les sépare pas très bien. Par contre le gradient de chlorure de césium sépare très nettement le "bottom" du "top" ce qui est normal puisque dans ce cas, le facteur prépondérant du déplacement des particules est la densité relative soluté/solvant (Meselson and al., 1957). Dans le tube de centrifugation en SW 39, deux bandes sont parfaitement visibles. L'analyse spectrophotométrique à 260 et 280 nm des fractions du gradient de chlorure de césium permet de construire la courbe de la figure 11. Le spectre des fractions correspondant au "bottom" et au "top" est reporté figure 12. Le spectre du "bottom" est typique d'une nucléoprotéine, avec un rapport de densité optique à 260 nm à la densité optique à 280 nm de 1,62, avec un maximum à 260 nm et un minimum à 241 nm. L'étude de ce rapport est importante car il caractérise un virus et peut donner une approximation de son pourcentage en acide nucléique (Brakke, 1969). Le VMG contiendrait, avec un rapport de 1,62, environ 20% d'acide

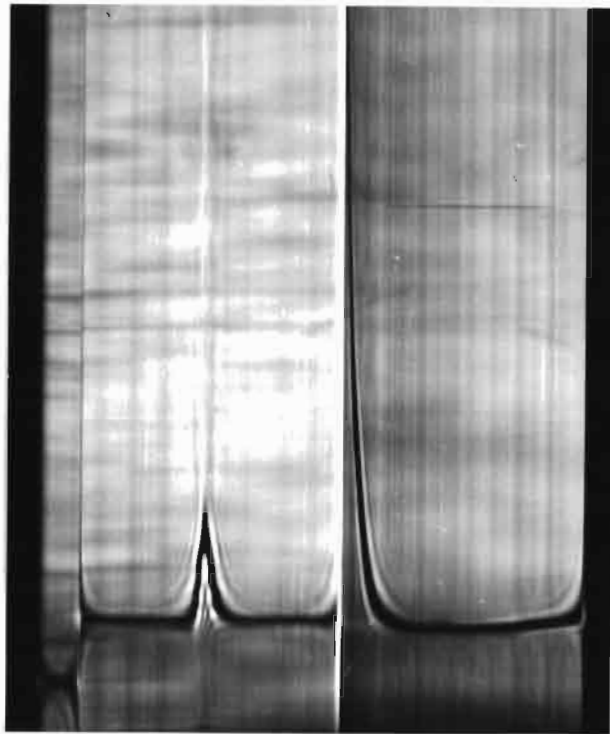


Figure 13. Profil de sédimentation analytique d'une suspension de VMG. 1 ml d'extrait purifié est centrifugé en tampon EDTA 0,01 M, phosphate de sodium 0,1 M à pH 7,3, vitesse de rotation 35 600 t/mn, température 22,7°C, angle de bar 15°. Photographie prise après 8 mn de rotation. Composant lourd 106 S, composant léger 42 S.

nucléique. Le spectre du "top" est typique d'une protéine avec un maximum à 278 nm et un minimum à 250 nm, et le rapport de l'absorption à 260 nm à l'absorption à 280 nm est de 0,6. Dans le cas du gradient de saccharose, le rapport des densités optiques pour le composant "top" est de 0,75, ce qui laisse supposer qu'il y a alors des contaminations par de l'acide nucléique.

### 3 - Ultracentrifugation analytique

Là encore, les deux composants du VMG sont toujours présents et distincts comme le montre la photographie de la figure 13.

Dans le cas précis de cette ultracentrifugation, 1 ml de suspension purifiée de VMG (densité optique de 29 unités) est centrifugé dans les conditions suivantes: tampon EDTA 0,01 M, phosphate de sodium 0,1 M à pH 7,3, vitesse de rotation 35 600 tours par minute, intervalle des prises de vue 2mn, température 22,7°C, angle de bar 15°. Le coefficient de sédimentation du composant lourd est alors de 106 S et celui du composant léger est de 42 S. Ces valeurs de S sont approximatives car elles n'ont pas été ramenées à la viscosité de l'eau; nous ne connaissons pas les corrections à appliquer au tampon EDTA.

### 4 - Nature de l'acide nucléique

Nous avons fait plusieurs expériences préliminaires permettant de savoir si l'acide nucléique du VMG était un acide ribonucléique ou un acide désoxyribonucléique ou bien si le virus possédait les deux types d'acide nucléique.

Premièrement nous avons fait des extractions d'acide nucléique par le phénol; l'analyse spectrophotométrique de ces solutions montre un spectre typique d'acide nucléique. Nous avons fait sur ces extraits les réactions de Mejbaum et de Dische. La première étant positive et la seconde négative, nous pouvons dire que l'acide nucléique du VMG est un acide ribonucléique.

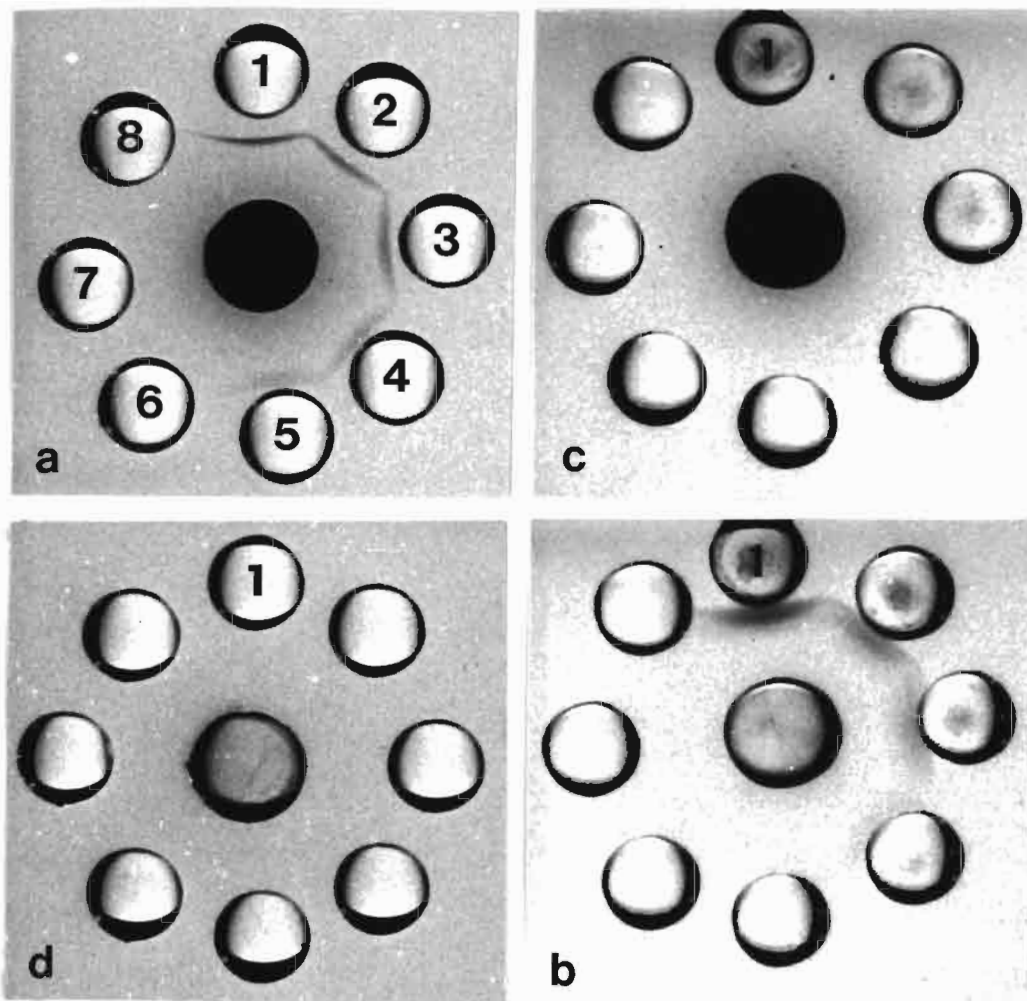
Deuxièmement nous avons fait agir la ribonucléase pancréatique sur des solutions purifiées de VMG en tampon PNa à pH 5, 7 et 9 pendant 10 minutes à 37°C, la concentration de la ribonucléase étant de 100  $\mu$ g/ml. Nous avons testé ces préparations par la méthode de Raymer et Diener en les comparant à des préparations témoins chauffées sans ribonucléase, non chauffées avec ribonucléase et non chauffées sans ribonucléase. Des expériences parallèles d'action de la désoxyribonucléase ont été faites en faisant agir l'enzyme à 100  $\mu$ g/ml pendant 30 minutes à 37°C sur le VMG purifié en solution dans le tampon PNa à pH 5, 7 et 9. Les préparations ont été testées par la méthode de Raymer et Diener avec les mêmes témoins que dans le cas de la ribonucléase.

Nous avons constaté que , surtout à pH 5, la ribonucléase inactive considérablement le pouvoir pathogène du VMG et qu'au même pH la désoxyribonucléase n'a pas d'action.

Nous pouvons donc conclure que le VMG est un virus à acide ribonucléique.

## 5 - Propriétés sérologiques

De très beaux arcs de précipitation sont obtenus en mettant en présence dans la gélose le VMG et son antisérum (figure 14a). Nous avons donc comparer sérologiquement le VMG avec différents



**Figure 14.** Test de double diffusion en gel d'agar mettant en présence le virus de la mosaïque du Brome (VMB) et le VMG avec leur antisérum.

- a - L'antisérum préparé contre le VMG est déposé dans le trou central à la dilution  $1/4$ . Une suspension purifiée non diluée de VMG se situe dans le trou 1; la même suspension diluée  $1/4$  est dans le trou 2, diluée  $1/8$  dans le trou 3 et ainsi de suite jusqu'au trou 7 où la suspension est diluée  $1/128$ ; et le trou 8 est rempli de la suspension diluée  $1/512$ .
- b - L'antisérum non dilué préparé contre le VMB est déposé dans le trou central et les trous périphériques sont remplis d'une suspension purifiée de VMB en 1 non diluée, en 2 diluée  $1/4$  ..., en 7 diluée  $1/128$  et en 8 diluée  $1/512$ .
- c - Le trou central est rempli de sérum anti-VMG non dilué et les trous périphériques par une suspension purifiée de VMB aux mêmes dilutions que dans a et b.
- d - Le trou central est rempli de sérum anti-VMB non dilué et les trous périphériques par une suspension purifiée de VMG aux mêmes dilutions que dans a et b.

virus. Ces derniers ont été choisis soit pour leur ressemblance morphologique, soit parce qu'ils avaient des hôtes communs avec le VMG, soit encore parce qu'ils avaient des propriétés biologiques semblables à celles du VMG.

Chaque test est réalisé avec les dilutions de sérum suivantes: 1, 1/4, 1/32, 1/128, 1/512, et de virus: 1, 1/4, 1/8, 1/16, 1/32, 1/64, 1/128 et 1/256 dans le cas d'un extrait brut ou 1/512 au lieu de 1/256 dans le cas d'un extrait purifié.

Nous avons testé de cette manière le virus de la mosaïque du Concombre, le virus de la mosaïque du "Cowpea", le virus de la mosaïque du Brome (figure 14), le virus de la panachure de la Fève, le virus de la mosaïque jaune du Navet, le virus de la mosaïque du "Sowbane", le virus de la mosaïque de l'Abutilon, le virus de la nécrose du Tabac, le virus de la mosaïque étoilée du Pétunia (souche du virus du rabougrissement de la Tomate) et le virus de la panachure de l'Oeillet en présence de l'antisérum fabriqué contre le VMG. Et nous avons testé le VMG en présence des antisérums spécifiques du virus de la mosaïque du Brôme (figure 14), du virus de la mosaïque du "Cowpea", du virus de la mosaïque du "Sowbane", et du virus de la nécrose du Tabac. Aucun arc de précipitation n'a été observé dans tous ces tests.

Par conséquent, les virus que nous venons de citer n'ont aucune relation antigénique avec le VMG et le VMG est différent de tous ces virus.



### CONCLUSION

Premièrement nous discuterons de l'identité de l'agent causal de la maladie du Gombo.

L'hypothèse d'un mycoplasme est à rejeter car les suspensions purifiées observées au microscope électronique révèlent de petites particules sphériques qui, par inoculation mécanique, reproduisent sur le Gombo les symptômes typiques de la maladie. De plus les mycoplasmes ont été observés dans le cas de maladies à symptômes fondamentalement différents: maladie des proliférations de *Malus sylvestris* (Giannotti et al., 1958); aucune particule virale n'a jamais pu être isolée à partir de ces maladies. Donc l'agent responsable de la maladie de la mosaïque et du "vein banding" du Gombo est un virus.

Vue la taille des particules sphériques observées en microscopie électronique, il pourrait s'agir de ribosomes mais cette hypothèse est aussi à écarter car, premièrement, ces organites ne sont pas pathogènes et l'inoculation des particules que nous avons isolées reproduit les symptômes caractéristiques de la maladie; deuxièmement, les ribosomes ne résistent pas aux traitements à la chaleur et à l'EDTA, alors que nous avons montré que les particules résistent à ces traitements.

Nous devons considérer une troisième hypothèse: y a-t-il un ou plusieurs virus responsables de la maladie du Gombo, puis que les symptômes observés sont toujours très variés? Cette dernière hypothèse est à éliminer parce que l'inoculation mécanique des extraits bruts faits à partir des 73 espèces de plantes infectées par le VMG a toujours provoqué les mêmes symptômes. L'examen au

TABLEAU 4

Caractères d'identi- fication et origine	Noms des Virus	Symptômes	Plantes hôtes	Transmission mécanique	Transmission par Aleyrodées	Transmission par Cuscutae	Transmission par Graine	Transmission par le Sol	Transmission par Greffe	Température d'inactivation ≤ 80°C	Température d'inactivation ≥ 80°C	Longévité in vitro	Résistance à la déshydratation	Point de dilution limite	Symétrie icosaédrique	Symétrie hélicoïdale	Etats-Unis d'Amérique	Texas	Floride	Californie	Brésil	Afrique du Sud	Côte d'Ivoire	Soudan	Europe	Indes	Nouvelle Guinée	Papou
	Abutilon mosaic virus 1 Baur	M	†	+	+		+		+	+		25h		+						+								
	Infectious chlorosis of Malvaceae	M	†		+															+	+							
	Leonurus Sibiricus mosaic	M	†		+															+	+							
	Cotton anthocyanosis	A		-		+														+								
	Cotton Leaf curl	Lc																					+					
	Cotton Leaf crumple	LC	†																									
	Hibiscus esculentus yellow vein mosaic virus	M	†	-	+	-	-	-	+											+						+		
	H. esculentus vein thickening	VT		?					+														+					
	H. cannabinus virus	?	†	+															+									
	H. ternifolius witches' Broom et phyllodie	WB P		-																			+					
	H. manihot mosaic disease	M	†	+	-	-	-		+																		+	
	H. rosa-sinensis leaf curl	Lc							+																	+		
	H. rosa-sinensis line pattern	LP				?			+													+						
	Malva yellow vein mosaic	M	†	+		+														+								
	Malva virus 1 Ryzhkov	M	†	+		+				+		35h	3j	$\frac{1}{500}$											+			
	Malva yellows virus	M		-		+														+								
	Malva vein clearing	VC															+				+							
	Wissadula amplissima mosaic virus	M			+													+										
	Jute mosaic virus	M	†		+	-			+																		+	
	Rhyncosia minima mosaic	M	†	-	+																+							
	Watermelon mosaic virus	M		+													+											
	Beet curly top virus	CT	†	+			+											+										
	Tobacco ringspot virus	RS	†	+		?	+	+		+		55h	$\frac{10^{-3}}{10^{-4}}$	+			+											
	Tobacco Broad ringspot	RS		+						+		42h	$>10^3$				+											
	Tobacco Streak virus	S		+		+				+		24h	$\frac{151}{200}$				+											
	Okra mosaic virus	M	=	+	+	-	-	-			+	9j	76j	$10^{-6}$	+								+					

Abréviations :

M = Mosaïque  
 LC = Leaf-curl  
 LC = Leaf-crumple  
 VT = Vein-thickening  
 WB = Witches-broom  
 LP = Line Pattern  
 VC = Vein clearing  
 CT = Curly top  
 RS = Ringspot  
 S = Streak  
 † = Different  
 + = Essai positif  
 - = Essai négatif

microscope électronique des nombreuses suspensions purifiées que nous avons préparées n'a jamais révélé qu'une sorte de particule icosaédrique de virion et de capside vide. En conséquence, nous estimons que la maladie de la mosaïque et du "vein banding" du Gombo est due à un seul virus.

Le travail présenté ici nous a permis d'établir un certain nombre de caractéristiques du VMG constituant des critères d'identification qui permettront de le comparer aux virus décrits dans la littérature.

Le tableau 4 présente en ordonnée toutes les maladies à virus isolés ou non qui ont été décrites chez les Malvacées et les virus qui sont hébergés par le Gombo, et en abscisse les caractéristiques des virus et leur origine géographique.

Le VMG est un virus à symétrie icosaédrique donc les virus à symétrie hélicoïdale cités dans ce tableau sont à éliminer en premier lieu: le "Watermelon mosaic virus" (Kitajima and al., 1962) et le "Malva vein clearing virus" (Komuro, 1962). Parmi les virus sphériques, l'AMV peut être éliminé à cause de sa grande taille (diamètre 80 nm) (Costa and Carvalho, 1960; Sun, 1965). Le critère de morphologie n'élimine que trois virus parce que les agents responsables de la plupart des maladies des Malvacées n'ont pas été observés en microscopie électronique.

Le VMG se transmet très facilement par voie mécanique, donc les virus non transmissibles mécaniquement sont rejetés: premièrement ceux qui ne sont transmissibles que par greffe: "H. rosa-sinensis line pattern virus" (Wolfswinkel, 1966), deuxième-

ment ceux qui sont transmissibles seulement par Aphides: "Cotton anthocyanosis virus" (Costa, 1956), "Malva yellows virus" (Costa and al., 1959), troisièmement les virus transmis seulement par Aleyrodes: "Leonurus sibiricus mosaic virus" (Flores and Silberschmidt, 1962), "infectious chlorosis of Malvaceae" (Orlando and Silberschmidt, 1946; Flores and Silberschmidt, 1967), "Wissadula amplissima mosaic virus" (Schuster, 1964), "H. esculentus yellow vein mosaic virus" (Capoor and Varma, 1950; Jha and Mishra, 1955), "Jute mosaic virus" (Bish and Mathur, 1964) et "Rhynchosia minima mosaic virus" (Bird, 1962).

Parmi les maladies transmises par voie mécanique, il en est qui sont aussi transmises par graines et par le sol: "Tobacco ringspot virus" (Wingard, 1928; MacLean, 1963), ou par Cuscutae: "Tobacco streak virus" (Fulton, 1948), ou bien par Aphides: "Malva yellow vein mosaic virus" (Costa and Duffus, 1957) et "Malva virus 1 Ryshkow" (Hein, 1956; Zoïls, 1966), ce qui n'est pas le cas du VMG. Ces quatre virus apparaissent donc différents du VMG; ceci est confirmé par l'examen de leurs hôtes, de leurs symptômes et de leurs propriétés biologiques que nous verrons plus loin. Le "Beet curly top virus" (Séverin, 1929), transmis mécaniquement mais seulement par piqûre et non par frottement, doit être lui aussi éliminé.

Le VMG se reproduit sur les 40 espèces de Malvacées que nous avons inoculées et sur un grand nombre de plantes appartenant à d'autres familles. Aucun des virus cités dans le tableau 4 ne possède la même liste d'hôtes. Ce critère d'identification n'est pas absolu ; il doit être employé en corrélation avec d'autres car il peut être le moyen de séparer deux souches d'un même virus.

Dans certains cas, l'étude peu approfondie des virus donne ce seul critère d'identification; il s'agit de "H. cannabinus virus" (Stoner, 1954). Ce virus est néanmoins écarté car il se reproduit seulement sur le genre Hibiscus. Ce critère est aussi utilisé pour éliminer "H. manihot mosaic disease" (van Velsen, 1967) mais, dans ce cas, d'autres critères viennent confirmer cette élimination: à l'inverse du VMG, cette maladie n'est pas transmise au Concombre, à l'Arachide, au Coton, à Ch. amaranticolor et à Ch. quinoa, et, de plus, n'est pas transmise par Aleyrodes.

L'étude de la symptomatologie constitue un deuxième critère non absolu qu'il faut employer en association avec d'autres. Cependant on admet que des symptômes aussi différents que "leaf curl" et mosaïque suffisent pour distinguer deux virus. De nombreuses études des maladies des Malvacées ne concernent que la description des symptômes ce qui nous oblige à différencier ces maladies, du VMG, grâce à ce seul caractère. Le VMG ne produit chez les Malvacées que des symptômes de mosaïque et de "vein banding". En conséquence, nous avons rejeté "Cotton leaf curl virus" (Tarr, 1951 et 1952), "H. rosa-sinensis leaf curl virus" (Mukherjee and Raychaudhuri, 1966), "Cotton leaf-crumple virus" (Laird and Dickson, 1959), "H. esculentus vein-thickening virus" (Yassin and Nour, 1965; Nour and Nour, 1964), "H. ternifoliolus witches' broom and phyllodie" (Nour, 1962).

Un dernier critère d'identification est celui des propriétés biologiques. Remarquons que les propriétés biologiques n'ont été étudiées que dans peu de cas. Ce critère nous permet de distinguer le "Tobacco broad ringspot virus" (point de thermoinactivation 54°C, longévité in vitro 42 heures, point de dilution limite

supérieur à  $10^{-3}$ ) (Johnson and Fulton, 1942; Sommereyns, 1967) du VMG (point de dilution limite  $10^{-6}$ , point de thermoinactivation  $80^{\circ}\text{C}$ , longévité in vitro 9 jours). Comme le montre le tableau 4, les propriétés biologiques des virus suivants: "Tobacco ringspot virus", Tobacco streak virus", "Malva virus 1 Ryshkow", et AMV sont très différentes de celles du VMG et viennent confirmer l'élimination que nous avons faite par ailleurs.

Nous pouvons conclure premièrement que le VMG est différent de tous les virus présentés dans le tableau 4.

Indépendamment de ce travail, nous avons commencé l'étude des propriétés sérologiques du VMG, dans le but de le rapprocher ou de l'identifier à des virus connus. Les virus rapportés dans le paragraphe 5 de Résultats ont été choisis soit pour leur ressemblance morphologique (virus parasphériques à composants "top") soit parce qu'ils avaient des hôtes communs, soit encore parce qu'ils avaient des propriétés biologiques semblables (essentiellement point de thermoinactivation élevé). Il en résulte que le VMG est différent du virus de la mosaïque du Concombre, du virus de la mosaïque du "Cowpea", du virus de la mosaïque du Brome, du virus de la panachure de la Fève, du virus de la mosaïque jaune du Navet, du virus de la mosaïque du "Sowbane", du virus de la mosaïque de l'Abutilon, du virus de la nécrose du Tabac, du virus de la mosaïque étoilée du Pétunia et du virus de la panachure de l'Oeillet. Cette étude sérologique n'est qu'une première étape et l'on envisage de la poursuivre.

D'après tous les résultats obtenus, nous pouvons avancer que le VMG est un nouveau virus parasphérique. Il provoque sur un grand nombre de plantes des symptômes de mosaïque et de "vein banding" et sur les Chénopodiacées un "spotting" et un "ring-spotting". Il se reproduit aisément sur de nombreuses plantes appartenant à différentes familles. Il est transmissible mécaniquement et par Aleyrodes, mais non par Aphides, ni par graines, ni par Cuscuta . Ses propriétés biologiques sont les suivantes: point de thermo-inactivation 80°C, longévité in vitro 9 jours, point de dilution limite  $10^{-6}$ , résistance à la déshydratation 76 jours. Il est résistant à la congélation-décongélation répétée. La technique de purification que nous avons mise au point a permis d'observer le VMG en microscopie électronique et de découvrir des particules virales à symétrie icosaédrique de diamètre 28,5 nm d'une part, de l'analyser au spectrophotomètre en lumière ultraviolette et de déterminer son rapport 260/280 nm égal à 1,62 d'autre part. L'ultracentrifugation analytique et en gradients confirme l'existence d'un composant léger constitué de capsides vides qui avaient été observées en microscopie électronique. Enfin des expériences préliminaires ont montré que le VMG est un virus à acide ribonucléique.

Dans la pratique, le contrôle de la virose a pu être établi grâce à l'utilisation d'insecticides qui prévient de l'invasion par Aleyrodes, et par l'élimination des variétés trop sensibles.

Pour parfaire l'identification du VMG, il nous reste à déterminer sa masse, à préciser ses teneurs en acide nucléique et

en protéine et à définir si l'acide nucléique est à simple ou double brin. Ces derniers critères nous permettront de compléter le cryptogramme de Gibbs (Gibbs and al., 1966) et ainsi de le classer parmi les autres virus.

Il serait intéressant d'étudier l'origine du composant "top". Il faudrait de plus faire l'étude du développement du virus dans la plante, de son extension géographique et de son épidémiologie.



BIBLIOGRAPHIE

- BAUR, E. (1904). Zur Ätiologie der infektiösen Panaschierung. Ber. Detsch. Bot. Ges. 22, 453-460.
- BAWDEN, F.C. (1950). Plant viruses and virus diseases. Chronica Botanica Company p.8.
- BIRD, J. (1962). A whitefly-transmitted mosaic of Rhynchosia minima and its relation to tobacco leaf curl and other virus diseases of plants in Puerto Rico. Report and abstracts of the 1961 Annual Meeting of the Caribbean Division of the American Phytopathological Society.
- BISHT, N. S., and MATHUR, R. S. (1964). Occurrence of two strains of jute mosaic virus in Uttar Pradesh. Curr. Sci. 33, 434-435.
- BOS, L. (1964). 2<sup>d</sup> imp. Symptoms of virus diseases in plants. Center for agricultural publications and documentation, Wageningen, the Netherlands.
- BRAKKE, M. K. (1960). Density gradient centrifugation and its application to plant viruses. Advances in Virus Research 7, 193-224.
- BRAKKE, M. K. (1969). Viruses, Vectors and Vegetation, by Karl Maramorosch. Interscience publishers. 527-553.
- CAPOOR, S. P., and VARMA, P. M. (1950). Yellow vein mosaic of Hibiscus esculentus. Indian J. Agric. Sci. 20, 217-230.
- COHEN, S., and NITZANY, F. E. (1966). Transmission and host range of the tomato yellow leaf curl virus. Phytopathology 56, 1127-1131.
- COSTA, A. S. (1956). Anthocyanosis, a virus disease of cotton in Brazil. Phytopathol. Z. 28, 167-186.
- COSTA, A. S., and BENNETT, C. W. (1950). Whitefly transmitted mosaic of Euphorbia prunifolia. Phytopathology 40, 266-283.

- COSTA, A. S., and DUFFUS, J. E. (1957). Occurrence of Malva yellow vein mosaic in California. Plant Dis. Repr. 41, 1006-1008.
- COSTA, A. S., and CARVALHO, A. M. (1960). Mechanical transmission and properties of the Abutilon mosaic virus. Phytopathol. Z. 37, 259-272.
- COSTA, A.S., DUFFUS, J. E., and BARDIN, R. (1959). Malva yellows, an aphid-transmitted virus disease. J. Amer. Soc. Sug. Beet Tech. 10, 371-393.
- FLORES, E. and SILBERSCHMIDT, K. (1958). Relations between insect and host plant in transmission experiments with infectious chlorosis of Malvaceae. An. Acad. Brasileira Ci 50, 535-560.
- FLORES, E., and SILBERSCHMIDT, K. (1962). Observations on a mosaic disease of Leonurus sibiricus occurring spontaneously in Sao Paulo. Phytopathol. Z. 43, 221-223.
- FLORES, E., and SILBERSCHMIDT, K. (1967). Contribution to the problem of insect and mechanical transmission of infectious chlorosis of Malvaceae and the disease displayed by Abutilon thompsonii. Phytopathol. Z. 60, 181-195.
- FULTON, R. W. (1948). Hosts of the tobacco streak virus. Phytopathology XXXVIII, 6, 421-428.
- GIANNOTTI, J., MORVAN, G., et VAGO, C. (1968). Micro-organismes de type mycoplasme dans les cellules libériennes de Malus sylvestris L. atteint de la maladie des proliférations. C. R. Acad. Sc. Sér. D 267, 76.
- GIBBS, A. T., HARRISON, B. D., WATSON, D. H., and WILDY, P. (1966). What's in a virus name? Nature, London, 209, 5022, 450-454.
- HEIN, A. (1956). Contributions to the knowledge of virus diseases of weeds. I. The Malva virus. Phytopathol. Z. 28, 205-234.
- JHA, A., and MISHRA, J. N. (1955). Yellow-vein mosaic of Bhendi (H. esculentus L.) in Bihar. Proc. Bihar Acad. Agric. Sci. 4, 128-130.

- JOHNSON, J., and FULTON, R.W. (1942). The broad ringspot virus. *Phytopathology* XXXII, 7, 605-612.
- KIRBY, R. H. (1948). Le jute et ses succédanés; possibilité de production dans l'Empire Britanique. *Cot. Fib. Trop.* 3, 3-4, 120-121.
- KITAJIMA, E. W., COSTA, A. S., and CARVALHO, A. M. (1962). Morphology of the Malva vein clearing virus. *Bragantia* 21, CIII-CVI.
- KLINKOWSKI, M. (1967). *Pflanzliche Virologie*. Akademie-verlag Berlin. I, 2-3.
- KOMURO, Y. (1962). At Nat. Inst. Agric. Sci. Nishihagara, Tokyo, watermelon mosaic virus. *Ann. Phytopathol. Soc. Jap.* 27, 31-36.
- LAIRD, Jr. E. F., and DICKSON, R. C. (1959). Insect transmission of the leaf-crumple virus of cotton. *Phytopathology* 49, 324-327.
- LEBEURIER, G., and HIRTH, L. (1966). Effect of elevated temperature on the development of two strains of tobacco mosaic virus. *Virology* 29, 385-395.
- MACLEAN, D. M. (1963). Symptoms of tobacco ringspot virus infections on eight important vegetables in the Rio Grande Valley. *J. Rio Grande Vall. Hort. Soc.* 17, 146-151.
- MELLENA, J. E., VAN BRUGGEN, E. F. J., and GRUBER, M. (1968). An assesment of negative staining in the electron microscopy of low molecular weight proteins. *J. M. B.* 31, 75-82.
- MESELSON, M., STAHL, F. W., and VINOGRAD, J. (1957). Equilibrium sedimentation of macromolecules in density gradients. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 43, 581-588.
- MUKERJEE, A. K., and RAYCHAUDHURI, S. P. (1966). Therapeutic treatments against leaf curl of some malvaceous plants. *Plant Dis. Repr.* 50, 88-90.

- NOUR, M. A. (1962). Witches' broom and phyllody in some plants in Khartoum Province, Sudan. F. A. O. Plant Prot. Bull. 10, 49-56.
- NOUR, M. A., and NOUR, J. J. (1964). Identification, transmission and host range of leaf curl viruses infecting cotton in the Sudan. Emp. Cott. Gr. Rev. 41, 27-37.
- ORLANDO, A., and SILBERSCHMIDT, K. (1946). Estudos sôbre a disseminação natural do vírus da "clorose infecciosa" das malvaceas (Abutilon virus 1 Baur) e a sua relação com o inseto-vetor "Bemisia tabaci Genn." (Homoptera, Aleyrodidae). Arquiv. Instituto Biol. (Sao Paulo) 17, 1-36.
- LOUDON, J. (1955). L'analyse immuno-chimique par la méthode des gels. Moyens et techniques d'identification des antigènes. Ann. Inst. Pasteur 89, 531-555.
- RAYMER, W. B., and DIENER, T. O. (1969). Potato spindle tuber virus: a plant virus with properties of a free nucleic acid. I. Assay, extraction and concentration. Virology 37, 343-350.
- SCHUSTER, M. F. (1964). A whitefly-transmitted mosaic virus of *Wissadula amplissima*. Plant Dis. Reptr. 48, 902-905.
- SEVERIN, H. H. P. (1929). Additional host plants of curly top. Hilgardia III, 20, 596-629.
- SOMMERREYNS, G. (1967). Les virus des végétaux. Ed. J. Duculot. Gembloux. 225-226.
- STONER, W. N. (1954). Annual Report of the Agr. Experiment Stations, Florida, for the year ending June 30. 1953. 354 pp.
- SUN, C. N. (1965). Structural alterations of chloroplasts induced by virus in *Abutilon striatum* var. Thompson. Protoplasma 60, 426-434.
- SYLVESTER, E. S. (1967). Retention of inoculativity in the transmission of pea enation mosaic virus by pea aphids as associated with virus isolates, aphid reproduction and excretion. Virology 32, 524-531.

- TARR, S. A. J. (1951). Leaf curl disease of cotton. Commonwealth Mycological Institute, Kew, Surrey.
- TARR, S. A. J. (1952). Rep. Res. Div. Minist. Agric., Sudan, 1949-1950, 46-55.
- VAN REGENMORTEL, M. H. V. (1966). Plant virus serology. Advances in Virus Research, Acad. Press. 12, 207-271.
- VAN VELSEN, R. J. (1967). A mosaic disease of Hibiscus manihot in Papua and New Guinea. Papua and New Guinea Agric. J. 19, 10-12.
- WINGARD, S. A. (1928). Hosts and symptoms of ringspot, a virus disease of plants. Journ. Agric. Res. XXXVII, 3, 127-153.
- WOLFSWINKEL, L. D. (1966). A virus disease in Hibiscus rosa-sinensis L. . S. Afric. J. Agric. Sci. 9, 483-485.
- YASSIN, A. M., and NOUR, M. A. (1965). Tomato leaf curl diseases in the Sudan and their relation to tobacco leaf curl. Ann. Appl. Biol. 56, 207-217.
- ZOIS, D. N. (1966). Transmission mécanique à de nouveaux hôtes et étude des propriétés physiques du virus Malva virus 1 Ryskhov. Ann. Inst. Phytopathol. Benaki N. S. 7, 127-132.

TABLE DES MATIERES

	Pages
<u>Introduction</u>	1
<u>Matériels et méthodes</u>	4
I - Source du virus	4
II - Multiplication du virus	4
III - Méthodes d'étude des propriétés biologiques	5
1 - Préparation de l'extrait brut	5
2 - Point de dilution limite	6
3 - Point de thermoinactivation	6
4 - Longévité in vitro	6
5 - Résistance à la dessiccation	6
IV - Analyse spectrophotométrique	7
V - Microscopie électronique	7
VI - Ultracentrifugation analytique	8
VII - Ultracentrifugation en gradients	8
1 - Gradient de chlorure de césium	8
2 - Gradient de saccharose	9
3 - Lecture des gradients	9
VIII - Sérologie	9
1 - Fabrication de l'antisérum	10
a . Préparation de l'inoculum	10
b . Technique d'inoculation	10
2 - Test sérologique	11
IX - Transmission mécanique	11
X - Transmission par insectes	12
1 - Transmission par Pucerons	12
2 - Transmission par Aleyrodes	13
XI - Transmission par Cuscute	14
<u>Résultats</u>	16
I - Transmissions	16
1 - Transmission mécanique	16
2 - Transmission par Pucerons	16

3 - Transmission par Aleyrodes	16
4 - Transmission par Cuscuta	17
5 - Transmission par graines	18
II - Résultat des inoculations mécaniques à des plantes appartenant à plusieurs fa- milles	18
III - Symptomatologie	19
1 - Symptômes chez les Malvacées	20
a . Symptômes chez H. esculentus	20
b . Le genre Hibiscus	21
c . Le genre Gossypium	21
d . Les autres Malvacées	22
2 - Symptômes chez les Chénopodiacées	22
3 - Symptômes chez les Légumineuses	23
4 - Symptômes chez les Cucurbitacées	23
5 - Symptômes chez les Solanacées	24
6 - Symptômes chez les Euphorbiacées	24
IV - Propriétés biologiques	24
1 - Evaluation du pouvoir pathogène des préparations de VMG par la méthode de Raymer et Diener	25
2 - Point de dilution limite	25
3 - Point de thermoinactivation	26
4 - Longévité in vitro	26
5 - Résistance à la dessiccation	27
6 - Résistance à la congélation-décongé- lation répétée	27
V - Technique d'extraction du virus	28
VI - Etude de quelques propriétés physico- chimiques	28
1 - Microscopie électronique	28
2 - Ultracentrifugation en gradient	29
3 - Ultracentrifugation analytique	30
4 - Nature de l'acide nucléique	30
5 - Propriétés sérologiques	31
<u>Conclusion</u>	33
<u>Bibliographie</u>	40