

SYNTHÈSES, NOTES ET ACTUALITÉS

ETUDE D'UNE SOUCHE DU VIRUS DE LA MOSAÏQUE DE LA CANNE À SUCRE *

par Pierre BAUDIN **

INTRODUCTION

HISTORIQUE DE LA MALADIE DANS LE MONDE

La mosaïque de la canne à sucre est une maladie connue depuis la fin du XIX^e siècle. Décrite en premier lieu à Java en 1890, elle est l'une des affections de la canne à sucre les plus largement répandues géographiquement. Parmi les importants pays producteurs de canne à sucre, seules la Guyane britannique et l'île Maurice n'ont pas encore signalé la présence de cette maladie (ABBOTT et STOKES, 1966). Dans de nombreux pays, la maladie a été la cause de graves épidémies et constitue partout un problème important de sélection variétale.

L'origine virale de la maladie a été établie par transmission artificielle : par voie mécanique et par l'insecte vecteur *Rhopalosiphum maydis*, Fitch (BRANDES, 1920 ; SEIN, 1930 ; MATZ, 1933). Des particules en forme de bâtonnets ont été associées pour la première fois à cette virose en 1955 (GOLD et MARTIN, 1955). La longueur de ces particules est de 750 nm à 760 nm (DIJKSTRA et GRANCINI, 1960 ; HEROLD et WEIBEL, 1963 ; PIRONE et ANZALONE, 1966). Nous désignerons dans le texte le virus de la mosaïque de la canne à sucre par l'appellation abrégée des auteurs anglo-saxons (SCMV).

La lutte contre cette maladie repose dans le monde entier sur la sélection

de variétés résistantes, obtenues par croisement interspécifique de la canne à sucre ou « canne noble » *Saccharum officinarum* avec des *Saccharum* sauvages. Ces croisements sont à l'origine de toutes les variétés modernes de canne à sucre. Mais il est apparu que les symptômes pouvaient être très variables sur une même variété, d'un pays à l'autre et d'une année à l'autre. Plusieurs souches virales sont en cause (STOREY, 1927 ; BRANDES, 1927).

Les souches américaines.

Aux USA, en 1948, dix souches de mosaïque ont été distinguées d'après les symptômes foliaires manifestés par deux variétés de canne à sucre CO 31-294 et CP 31-588, toutes deux plus ou moins sensibles à toutes les souches jusque-là connues de mosaïque (SUMMERS, BRANDES et RANDS, 1948). Des caractères complémentaires ont été utilisés : coloration de la gaine, retard de croissance, reprise des souches de canne après coupe, pourcentage d'infection, longueur de la période de latence après l'infection, température d'inactivation et dilution limite des extraits infectieux (ABBOTT et TIPPETT, 1966).

Ces souches ont reçu les dénominations suivantes : A, B, C, D (D-a, D-b, D-c), E, F et G. La souche G n'a plus été observée aux USA depuis 1944. Les distinctions D-a, D-b et D-c

ont été abandonnées par la suite. La souche F n'a été observée qu'en 1935. La souche G, différenciée en raison d'un retard de croissance de la variété CP 31-294 par rapport à la même variété inoculée avec la souche B n'a pas été retenue (SUMMERS, BRANDES et RANDS, 1948 ; ABBOTT et TIPPETT, 1966). Les souches A, B et D sont toujours en collection à l'U. S. Sugar Cane Field Station de Houma. La souche E disparue, a été réisolée à partir de *Stenotaphrum secundatum* (TODD, 1964).

La sélection de variétés résistantes ou tolérantes a été faite selon le schéma suivant, qui est encore utilisé (ABBOTT, ZUMMO et TIPPETT, 1967 ; ANZALONE, GIMALVA et CHILTON, 1967). Les nouveaux plants de canne à sucre, obtenus de semis, sont inoculés mécaniquement avec un inoculum contenant le mélange des souches connues, dès que les feuilles sont assez grandes pour l'inoculation. Le taux de transmission ainsi obtenu est plus important que par exposition à l'insecte vecteur *Rhopalosiphum maydis* ; les jeunes plants de semis sont plus sensibles que les cannes de même âge issues de boutures et que les plants plus âgés (DEAN et COLEMAN, 1967). Les plants qui manifestent des symptômes de mosaïque sont éliminés. Cette sélection est poursuivie au champ où des cas de maladie peuvent encore se manifester.

ABREVIATIONS

EDTA	éthylène-diamine tétracétate de sodium.	VMT	Virus de la Mosaïque du tabac.
p DAB	p diméthylaminobenzaldéhyde.	ARN	acide ribonucléique.
SDS	dodécyl sulfate de sodium.	DEP	Point limite de dilution.
Tris	trihydroxyamino-méthane.	TIP	température d'inactivation thermique.
MDMV	<i>Maize Dwarf Mosaic Virus</i> .	DO	densité optique.
MDMV-A	<i>Maize Dwarf Mosaic Virus</i> souche A.	nm	nanomètre (= 1/1000 µ).
SCMV	Virus de la Mosaïque de la canne à sucre.	s	coefficient de sédimentation.
SCMV-A...	Virus de la Mosaïque de la canne à sucre, souche A...		

(*) Thèse présentée le 10 janvier 1976 devant l'Université Louis-Pasteur de Strasbourg pour obtenir le grade de Docteur-Ingénieur.

(**) BAUDIN (P.). — Ingénieur en chef de Recherches IRAT, Division de Défense des Cultures. IRAT-Montpellier.

22 OCT. 1979

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

Collection de Référence

n° 9513 P2A

Parmi les géniteurs de canne à sucre, *Saccharum officinarum*, *S. barberi* et *S. robustum* sont sensibles à la mosaïque, *S. sinense* est très résistant tandis que *S. spontaneum* est immun (SUMMERS, BRANDES et RANDS, 1948).

La sélection de variétés résistantes a permis de cultiver aux USA des cannes résistantes durant de nombreuses années. Mais à partir de 1957, la variété CP 44-101, sélectionnée et multipliée pour sa résistance à la mosaïque, a été contaminée par une nouvelle souche du virus, la souche H (ABBOTT, 1961). Cette nouvelle souche a été différenciée sur la variété CP 31-588 par un pourcentage d'infection plus faible qu'avec les souches A, B et D. Par ailleurs, 32 clones sur 181 de *S. spontaneum* et l'hybride Kassoer sont sensibles à cette souche alors qu'ils sont très résistants ou immuns aux autres souches. Par la suite, les deux variétés de canne à sucre CP 31-294 et CP 31-588 ayant manifesté des symptômes nouveaux lors de tests de contrôle, une nouvelle souche I a été décrite. Cette souche contamine les mêmes clones de *S. spontaneum* que la souche H, ainsi que Kassoer, mais avec la différence que le pourcentage d'infection est plus élevé avec la souche I qu'avec la souche H (TIPPETT et ABBOTT, 1968).

Les souches indiennes.

Aux Indes, trois souches ont été différenciées par leur température d'inactivation (CHONA, 1944). Ces températures sont respectivement de 45, 52 et 65 °C, alors que celles des souches américaines sont comprises entre 49 et 55 °C (ABBOTT, 1953). Les souches américaines A et B y sont également signalées (MATZ, 1939; ABBOTT et TIPPETT, 1966), ainsi que les souches C et E (KHURANA et SHATRUGHNA SINGH, 1972). Mais des isolats à partir de la variété CO 419 n'ont pu être rapportés à des souches américaines, ce qui peut expliquer les résultats de CHONA (1944).

Les souches de Taïwan.

Trois souches ont été décrites à Taïwan d'après les symptômes manifestés par des variétés de cannes différentes des variétés américaines (LIU et LI, 1953). Ces souches sont :

- le type « *Short Stripe* » ou SS,
- le type « *Yellow Stripe* » ou YS,
- le type « *Fine Stripe* » ou FS.

Mis à part les variations de symptômes et les retards de croissance, des résistances différentes selon les espèces de *Saccharum* ont été observées. *S. officinarum*, *S. barberi* et *S. robustum* sont sensibles aux types SS et YS, comme aux souches améri-

caines. Le type YS est considéré comme très proche de la souche américaine A (ABBOTT et STOKES, 1966). *S. sinense* est sensible à la souche FS, alors que *S. barberi* est immun, à l'inverse des souches américaines. Lorsqu'elles sont inoculées avec le type FS, les variétés américaines de canne manifestent des symptômes inconnus aux USA.

Les souches de SCMV dans le monde.

Une revue de la répartition des souches dans les diverses parties du monde a été faite en 1966, avant que le *Maine Dwarf Mosaic Virus* (MDMV) et le SCMV-I soient connus (ABBOTT et STOKES, 1966). Les souches A, B et D ont été signalées dans diverses parties du monde, mais non la souche H. Cinq souches originaires des Indes, d'Iran, des Philippines et de Hawaï provoquent des symptômes différents de ceux des souches américaines.

Les souches de MDMV.

Des inoculations artificielles ont permis de montrer que de jeunes plants de certaines variétés de sorgho et de maïs pouvaient se montrer, au laboratoire, hôtes du SCMV (COSTA et PENTEADO, 1951; SMITH, 1957). Mais jusqu'en 1965, le SCMV n'était pas considéré comme un agent pathogène pour les cultures de sorgho ou de maïs. Toutefois une affection, appelée *Red Stripe* du sorgho, observée pour la première fois en Italie par GOIDANICH (1939) a été reconnue comme étant due à un virus voisin de celui de la mosaïque de la canne à sucre (GRANCINI, 1957; LOVISOLO, 1957). Puis aux USA, les cultures de maïs ont été gravement affectées par une épidémie de MDMV (DALE, 1964; WILLIAMS et ALEXANDER, 1964). Ce virus a été reconnu comme étant une souche de SCMV, mais il n'infecte pas *S. officinarum* (SHEPHERD, 1965). On peut, sur le sorgho d'Alep (*Sorghum halepense*), différencier deux souches de ce virus : il est sensible à MDMV-A et résistant à MDMV-B (MAC KENZIE, 1967). De graves viroses du maïs et du sorgho ont été également imputées à des souches de SCMV ou de MDMV en Afrique du Sud (VON WECHMAR et HAHN, 1967), en Australie (TAYLOR et PARES, 1968) et en Europe dont la France (SIGNORET, 1970).

Ces très nombreux résultats n'ont pas toujours été comparés entre eux, en ce qui concerne les relations entre les différentes souches. Comme l'ont souligné BANCROFT et al (1966), les graminées dont la canne à sucre, le maïs, le sorgho et le sorgho d'Alep sont affectées par divers virus appartenant tous au groupe *Potato Virus Y*. de BRANDES, les rapports entre ces différents virus restent à être précisés.

Ce grand nombre de souches virales pose deux types de problèmes aux agronomes :

1) la lutte par variétés résistantes suppose une bonne connaissance de la souche ou des souches virales concernées. L'histoire de la culture de la canne à sucre en Louisiane montre bien la complexité du problème sur le plan pratique. Les épidémies de mosaïque ont été dues, soit à l'ensemble des souches décrites aux USA, soit seulement à l'une d'entre elles. L'importance relative des souches a varié, notamment quand en culture industrielle, des variétés sensibles ont été remplacées par des variétés résistantes à la souche prédominante, mais qui se sont révélées par la suite sensibles à une souche qui tendait alors à devenir prépondérante. Enfin il est apparu de nouvelles souches auxquelles les géniteurs de résistance se sont montrés sensibles. C'est ainsi qu'à partir de 1956, la souche H inconnue jusque-là, a été responsable de 70 % des attaques car la plupart des variétés cultivées se sont trouvées sensibles à cette nouvelle souche (ABBOTT et TIPPETT, 1966).

2) le développement de la production de canne à sucre demande une importante circulation de matériel végétal sous forme de boutures, moyen le plus efficace de transmission des virus sur de longues distances, ainsi que d'autres maladies systémiques. L'ensemble des pays sucriers se protège en cultivant pendant un ou deux-trois ans en serre vitrée les nouvelles introductions de cannes. Une opération de quarantaine n'est pas très coûteuse en soi, mais peut entraîner des pertes importantes par le retard qu'elle provoque aux programmes de renouvellements variétaux dans les pays comme Madagascar qui ne produisent pas eux-mêmes leurs nouvelles variétés. En l'absence de test sûr, permettant de déceler certaines maladies comme la mosaïque, les responsables de quarantaine peuvent être tentés de détruire les variétés présentant des symptômes plus ou moins douteux qui puissent faire penser à une mosaïque. Il est donc indispensable de mettre au point un système plus simple pour assurer une introduction sans risques de nouvelles variétés.

LA MOSAÏQUE A MADAGASCAR

La mosaïque de la canne à sucre aurait épargné Madagascar jusqu'en 1952 (BARAT, 1953), alors qu'elle était déjà répandue dans cette région de l'océan Indien, à l'île de Mayotte dans l'archipel des Comores (BOURIQUET, 1946), à l'île de la Réunion (KOPP et d'EMMEREZ, 1932) et au Natal (STOKEY, 1924). En 1952, les symptômes de la maladie ont été reconnus par

BARAT (1953) sur la côte Est de Madagascar, près de Brickaville, dans des plantations de variété Lousier, canne « noble » jusque-là cultivée dans cette région. Les champs étaient en très mauvais état sanitaire, dû à diverses maladies. La même année, des symptômes de mosaïque ont été observés sur la côte Ouest de Madagascar sur la variété M 72-52 sans qu'il y ait de corrélation avec une baisse de rendement de ces cannes. Des variétés résistantes à la mosaïque ont alors été propagées en culture industrielle, et les symptômes n'ont plus été observés durant plusieurs années.

En 1964, nous avons remarqué des symptômes de mosaïque dans la province de l'Itasy, sur l'Ouest des hauts plateaux de Madagascar. Etaient contaminées toutes les cultures de cette région, plantées en variété Lousier, destinées à la production artisanale de sucre et d'alcool pour la consommation familiale. Les années suivantes, les cultivateurs abandonnèrent d'eux-mêmes cette production, la virose détruisant toutes les cultures. Plusieurs épidémies de mosaïque sur maïs ont été observées dans la même région ces dernières années.

La présence d'un foyer épidémique important dans le centre de Madagascar était préoccupante pour l'ensemble des cultures de canne à sucre de la grande île. Deux types de problèmes se posent :

— le foyer de la maladie est-il le point de départ d'une épidémie susceptible de s'étendre dans tout Madagascar, et en particulier dans les régions côtières où sont présentes les cultures industrielles ?

— peut-on utiliser les résultats de sélection de variétés résistantes obtenues avec les diverses souches de SCMV et de MDMV ? Dans quelles conditions peut-on introduire le nouveau matériel végétal ?

Il importe en premier lieu de déterminer la cause précise des symptômes. Pendant longtemps les virus n'ont été

mis en évidence que par les lésions provoquées sur un organisme vivant, conséquence de leur multiplication. C'est une de leurs caractéristiques essentielles d'être connus à travers un système virus-hôte. Ainsi, la virose qui sévit à Madagascar sur les cannes à sucre a pu être rapportée à une souche de SCMV ou de MDMV par inoculation mécanique au maïs et au sorgho, ainsi qu'à diverses autres graminées (BAUDIN, 1970). Mais les nombreuses souches décrites de SCMV et de MDMV constituent un ensemble hétérogène de virus aux propriétés physico-chimiques et biologiques assez différentes (BANCROFT et al, 1966). La souche locale, désignée dans le texte sous le nom de SCMV-Ampefy, doit être comparée aux autres souches avec plus de précision.

Les techniques d'isolement et de purification de virus peuvent permettre de déterminer leurs caractéristiques physiques, chimiques, de les observer au microscope électronique et d'en analyser la structure. On peut ainsi étudier les virus en dehors du système virus-hôte et, grâce à de nouveaux critères physico-chimiques indépendants de la maladie, les différencier d'après leur structure. Ainsi les propriétés physico-chimiques de la souche SCMV-Ampefy peuvent être comparées avec celles déjà connues de quelques souches de SCMV ou de MDMV.

Le virus purifié permet de préparer des sérums spécifiques. On peut alors comparer les propriétés antigéniques de la souche SCMV-Ampefy avec celles des diverses souches de SCMV et de MDMV, afin d'établir les parentés sérologiques.

Le virus étant caractérisé par ses propriétés biochimiques et sérologiques, il convient alors d'étudier les propriétés biologiques dont dépend la maladie. En premier lieu, il est nécessaire de préciser la symptomatologie de la souche SCMV-Ampefy. Les symptômes sur une gamme d'hôtes permettent d'identifier de nombreux virus qui peuvent ne pas avoir de caractères

en commun. Mais le problème n'est pas seulement de reconnaître le SCMV mais aussi de déterminer de quelles souches déjà connues la souche SCMV-Ampefy peut être rapprochée. Des pathogènes capables de provoquer une maladie sur un certain groupe d'hôtes doivent alors être distingués sur un ou plusieurs hôtes qui manifestent des réactions différentes sous la seule influence des souches inoculées et non sous l'influence de l'environnement.

Les interactions différentielles entre hôtes et parasites ont été étudiées par VAN DER PLANCK (1968) pour diverses maladies à champignons et bactérioses. En s'inspirant de ces études, nous avons tenté de trouver un ou des hôtes caractéristiques de SCMV-Ampefy.

Les relations hôtes-virus peuvent être modifiées par les conditions de milieu, en particulier la température. L'influence de la température sur la multiplication virale dans la plante est étudiée. Le SCMV et le MDMV se multiplient surtout dans des plantes tropicales, aux températures optimales de croissance élevées, de 25° à 35°. Par contre, la température d'inactivation de ces virus est relativement basse, de l'ordre de 55°. Beaucoup de virus sont instables *in vivo* à des températures supérieures à 30°, même le VMT qui est l'un des virus les plus stables à la température *in vitro* (LEBEURIER et HIRTH, 1966). Il est donc indispensable de déterminer la température optimum de multiplication : virus *in vivo*.

Les résultats de la symptomatologie et l'étude de l'influence de la température sur la multiplication virale dans la plante permettent de définir quelques facteurs écologiques particulièrement favorables à la maladie. Ces derniers peuvent être comparés aux conditions agronomiques des cultures de Madagascar et permettre quelques suggestions sur les facteurs d'extension éventuelle de la maladie dans la grande île et sur l'amélioration de la lutte.

MATERIEL ET METHODES

MATERIEL VEGETAL

Conditions de multiplication du virus.

Le SCMV-Ampefy est conservé sur une parcelle de canne à sucre, variété Lousier, cultivée à l'extérieur. La canne utilisée est un sport apparu à l'île Maurice de la variété Otahiti de *Saccharum officinarum*. Il a été introduit à Madagascar il y a une cinquantaine d'années, et il est répandu dans toute l'île de Madagascar dans les cultures artisanales.

La parcelle a été plantée par éclats de souches, boutures de tiges et de flèches d'une souche de canne provenant du village d'Ampefy dans la préfecture de l'Itasy. La culture de canne est conduite comme à l'ordinaire dans la région de Tananarive. Les tiges sont coupées en début de saison des pluies en conservant tous les rejets immatures. Au cours de ce travail, la parcelle a été maintenue jusqu'en sixième repousse. Mais en raison de la mortalité élevée des souches malades, de fréquentes replan-

tations ont dû être faites, avec du matériel virosé prélevé sur place, ou du matériel sain qui a été inoculé. La parcelle de canne à sucre a pu fournir des feuilles virosées neuf mois par an. Les feuilles ont toujours été récoltées juste avant le broyage.

Le virus a également été multiplié en serre ordinaire sur maïs, variété LA 122, et sur sorgho, variété Tx 412. Les plants sont semés par 10 dans des pots de 30 cm de diamètre. Après huit à quinze jours, selon la température

ambiante, ils sont inoculés par le SCMV-Ampely et ils peuvent être récoltés quinze jours plus tard. Chaque semaine, l'ensemble des plants et du matériel contenu dans la serre est pulvérisé au dimétonméthyl à dose de 50 ml de produit pour 100 litres d'eau.

Inoculation du virus.

Les extraits virosés bruts sont préparés par broyage au mortier des feuilles de canne à sucre, maïs ou sorgho, en présence d'un peu de sable de Fontainebleau, lavé aux acides, et de tampon phosphate 0,01 M pH 7,2 additionné de mercaptoéthanol à 0,2%, à raison de 2 ml de tampon par gramme de feuilles (dilution 1/2). Les feuilles de canne à sucre doivent être préalablement finement découpées aux ciseaux en lanières perpendiculaires aux fibres des feuilles. Pour des inoculations en série, la dilution 1/10 est utilisée, soit le cinquième de l'extrait brut.

Le virus est inoculé à la canne à sucre selon la méthode de MATZ (1933), utilisée en sélection variétale. Quelques gouttes d'extrait brut de canne virosée sont déposées entre la plus jeune feuille déroulée et le fuseau central. Une fine aiguille est passée plusieurs fois à travers les tissus.

Le virus est inoculé au maïs et au sorgho par frottement entre le pouce et l'index de la première feuille déroulée, préalablement saupoudrée de carborundum (400 mesh). Les résultats peuvent être observés au bout de cinq à huit jours sur la base de la première feuille qui se dégage du fuseau foliaire. Les plants sont gardés en observation une quinzaine de jours après l'apparition des premiers symptômes.

Détermination du pouvoir infectieux.

En l'absence d'un hôte à nécroses locales, le pouvoir infectieux est étudié sur les hôtes à réaction systémique. Deux méthodes sont utilisées :

POINT DE DILUTION LIMITE OU DEP

Le point de dilution limite correspond à la plus grande dilution d'un extrait virosé à laquelle on peut encore espérer une infection. Cette méthode est très utilisée pour évaluer la teneur en virus d'extraits de plantes. Des plants de maïs, variété Dixie 22, sont inoculés par une gamme de dilutions de l'extrait à étudier, la dilution 1/1 correspondant au broyage d'un gramme de feuilles dans 1 ml de tam-

pon. A partir de la canne à sucre ou du maïs, il n'est pas utile de dépasser la dilution 1/5.000. La plus grande

dilution de la gamme qui donne une infection est retenue comme Point de Dilution Limite ou DEP.

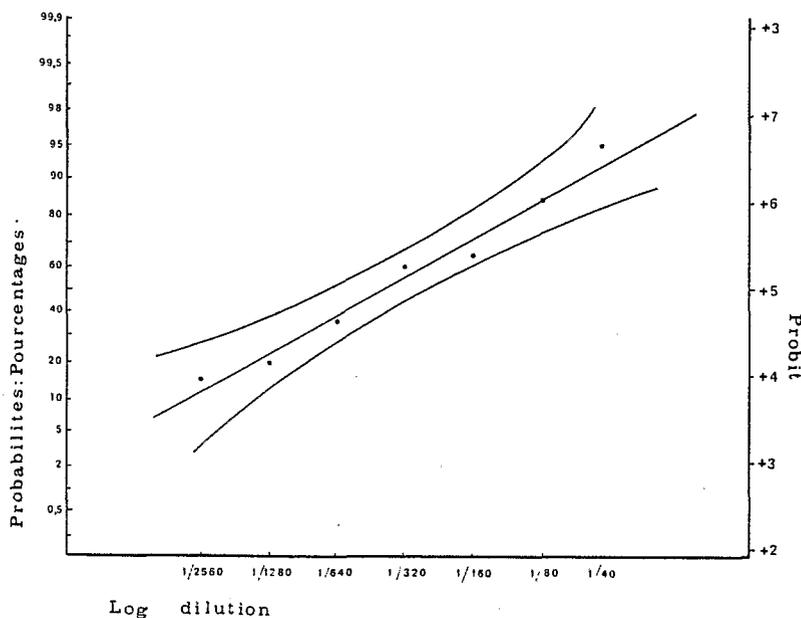


Fig. 1

Représentation graphique sur papier de Probit des résultats expérimentaux du tableau I.

RAPPORT ENTRE LE POURCENTAGE D'INFECTION ET LA DILUTION DES EXTRAITS INFECTIEUX

Avec un hôte à nécroses locales, il est possible de déterminer le nombre de points d'infection obtenus en inoculant une suspension virale de concentration donnée, à condition que le nombre de particules virales infectieuses soit suffisamment faible par rapport au nombre de sites infectables (HOLMES, 1929 ; VAN DER PLANCK, 1975). On peut ainsi obtenir la courbe des nombres cumulés représentant les points d'infection par rapport à la concentration en particules infectieuses. Avec le VMT, virus à un seul type de particules, cette courbe est une droite (FURUMOTO et MICKEY, 1970).

Avec un hôte à infection généralisée, le nombre de points d'infection n'est pas connu puisqu'un seul plant peut être infecté plusieurs fois pour donner une infection généralisée. Par contre, si un plant inoculé n'est pas infecté, il n'y a pas de point d'infection. On peut étudier la distribution de la probabilité pour qu'un plant inoculé par un extrait à une dilution convenable ne soit pas infecté : si p est le pourcentage de plants contaminés, le pourcentage de plants sains est égal à q = 100 - p. Il faut étudier la distribution de q par rapport à la concentration. Les résultats expérimentaux

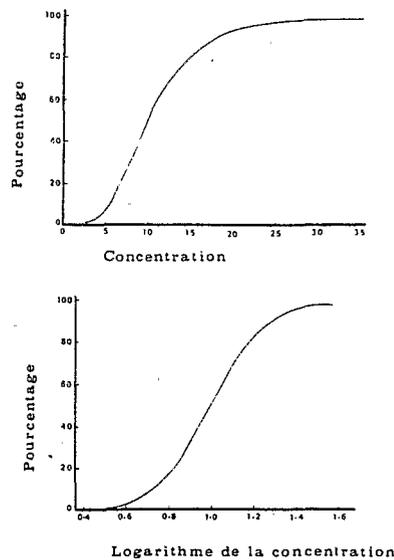


Fig. 2

Courbes qui correspondent à une transformation Probit :

- en haut : pourcentage des plants infectés en fonction de la concentration ;
- en bas : pourcentage des plants infectés en fonction du logarithme de la concentration.

(on peut utiliser directement p) ont été portés sur des graphes dont abscisses et ordonnées correspondent aux fonctions mathématiques suivantes :

- une droite,
- une distribution de POISSON

(BRAKKE, 1970 ; VAN DER PLANCK, 1975),

- une transformation log log (BRAKKE, 1970),
- une fonction Probit selon la méthode d'estimation du maximum de vraisemblance (FINNEY, 1952).

Les points expérimentaux ne correspondent pas à une droite. Ils sont correctement alignés par contre si on utilise les coordonnées « Probit » (fig. 1). Ces coordonnées correspondent à une courbe du type sigmoïdal (fig. 2).

Tableau I

POUVOIR INFECTIEUX D'UNE GAMME DE DILUTION D'UN EXTRAIT VIROSE DE MAÏS, VAR. DIXIE 22
Les extraits sont inoculés par frottement à des maïs, var. Dixie 22, cultivés à 20°.

Dilution	Nombre de plants contaminés sur le nombre de plants inoculés
1/40	19/20
1/80	17/20
1/160	13/20
1/320	12/20
1/640	6/20
1/1280	4/20
1/2560	3/20

Tableau II

CALCUL DE LA DROITE « PROBIT » CORRESPONDANT A L'EXPERIENCE RELATEE TABLEAU I

Dilution	Dil. × 10 ⁴	x	$\frac{r}{n}$	p	yo	ye	nw	WP	nwx	nwy
1/40	250	2,398	19	95	6,64	6,6	4,76	6,643	11,41448	31,6064
1/80	125	2,097	17	85	6,04	6,1	8,10	6,034	16,98570	48,8430
1/160	62,5	1,796	13	65	5,39	5,6	11,16	5,373	20,04336	59,9292
1/320	31,25	1,495	12	60	5,25	5,2	12,54	5,252	18,47730	65,8350
1/640	15,625	1,194	6	36	4,64	4,7	12,32	4,642	14,71008	57,1648
1/1280	7,8125	0,893	4	20	4,16	4,2	10,06	4,166	8,98358	41,8496
1/2560	3,90625	0,592	3	15	3,96	3,8	7,40	3,980	4,38080	29,4520
Sommes ..		10,465			36,08		66,34	36,07	95,26530	334,680

$\bar{x} = 1,436016$

$\bar{y} = 5,044920$

$S n w x^2 = 155,1956301 - 136,8024929$

$S n w x y = 507,3341344 - 480,60586276$

$S n w y^2 = 1.728,401308 - 1.688,433861$

$S n w (x - \bar{x})^2 = 18,3931372$

$S n w (x - \bar{x})(y - \bar{y}) = 26,7283068$

$S n w (y - \bar{y})^2 = 39,967447 - 38,840703$

$X^2 (5) = 1,126744$

$< 11,07$

$b = 1,453167369$

Droite de régression : $y = 2,958 + 1,453 x$

Tableau II bis

LEGENDE DES CALCULS EXPOSES TABLEAU II

Dil. × 10⁴ : les dilutions sont multipliées par 10⁴ pour simplifier les calculs.
 x : logarithme de la dilution.
 r : nombre de plants montrant des symptômes.
 n : nombre de plants inoculés.
 p : pourcentage $\frac{r}{n} \times 100$.
 yo : Probit observé, lu dans la Table I (FINNEY, 1952) pour le pourcentage p.
 ye : Probit estimé après dessin à l'estime de la droite Probit.
 nw : w est le coefficient de pondération lu dans la Table II pour le Probit ye.
 WP : Working Probit lu dans la Table IV pour le Probit ye et le pourcentage p.
Somme des carrés des déviations :
 $S n w (x - \bar{x})^2 = S n w x^2 - \frac{(S n w x)^2}{S n w}$
 $S n w (x - \bar{x})(y - \bar{y}) = S n w x y - \frac{(S n w x) \times (S n w y)}{S n w}$
 $S n w (y - \bar{y})^2 = S n w y^2 - \frac{(S n w y)^2}{S n w}$
Coefficient de régression :
 $b = \frac{S n w (x - \bar{x})(y - \bar{y})}{S n w (x - \bar{x})^2}$
Droite de régression :
 $Y = \bar{y} + b (x - \bar{x})$
 $X^2 (n - 2) = S n w (y - \bar{y})^2 - \frac{S n w (x - \bar{x})(y - \bar{y})^2}{S n w (x - \bar{x})^2}$

Tableau III
 DETERMINATION DE LA DILUTION QUI DONNE 60% DE PLANTS INFECTES
 A PARTIR DES RESULTATS EXPERIMENTAUX DU TABLEAU I
 Droite de régression $y = 2,958 + 1,453 X$

x	n w	y	n w x	n w y
2,293	6,04	6,61	14,48392	39,9244
2,092	8,78	6,04	18,41166	53,0312
1,796	11,16	5,37	20,04336	59,9292
1,495	12,68	5,25	18,95660	66,5700
1,194	12,32	4,64	14,71008	57,1648
0,893	10,64	4,17	9,50152	44,3688
0,592	7,40	3,98	4,38080	29,4520
10,465	69,02	36,06	100,48794	350,4404
$n w x^2$ 166,3218092 - 146,3026989 20,0189103		$n w x y$ 539,4118244 - 510,2149215 29,1969029	X^2 (5 dl) - 43,685353 42,582694 1,102659	$n w y^2$ 1.823,002564 - 1.779,317211 43,685353 42,582694 1,102659

$b = 1,45846$

Droite de régression corrigée : $y = 2,954 + 1,459 x$.

$m_p = x + y(p) \times x$ avec $y_p = \text{probit pour le pourcentage } p$.

$m_p = \bar{x} + \frac{y(p) - \bar{y}}{b}$ avec $y_p = \text{probit pour le pourcentage } p$.

Pour 60% : $m = 1,4559 + \frac{5,25 - 5,0774}{1,459} = 1,5745$.

Variance : $(m) = \frac{1}{b^2} \left[\frac{1}{S_{nw}} + \frac{(m - \bar{x})^2}{S_{nw}(x - \bar{x})^2} \right] = 0,0071358$

Ecart type : $S = 0,084$

La dilution pour $p = 60$ est $m \pm st = 1,5745 \pm 0,21588$

$\frac{1}{438} < Dil(p = 60) = \frac{1}{260} < \frac{1}{162}$

A partir de résultats expérimentaux, les paramètres de la droite « Probit » peuvent être déterminés selon le plan suivant :

— 1) Sur un papier Probit, dessiner la droite des points ayant pour abscisse la concentration, pour ordonnée le pourcentage de plants contaminés (fig. 1).

— 2) Relever les probits y_0 observés, correspondant aux pourcentages dans la table des probits (FINNEY, 1952) (tableau II).

— 3) Déterminer les probits estimés y_e à partir de la droite Probit.

— 4) Déterminer à l'aide de la table II (FINNEY, 1952) le coefficient de pondération nw .

— 5) Déterminer à l'aide de la table IV (FINNEY, 1952) le « Working Probit ».

— 6) Calculer la régression pondérée entre le log (dilutions) n, w et y .

— 7) Calculer le X^2 d'ajustement à la distribution.

— 8) Si le X^2 n'est pas significatif, déterminer les paramètres de la droite de régression.

— 9) D'après la droite de régression, on calcule les probits y , on en déduit les valeurs corrigées « nw » ainsi que les paramètres de la droite de régression corrigée (tableau III).

La droite de régression étant redéterminée, il est possible de calculer

pour quelques pourcentages les dilutions correspondantes et les limites de l'erreur. On peut ainsi tracer les courbes donnant les limites de confiance de la droite de régression.

D'après la figure 1, on observe que l'intervalle de confiance est le plus étroit pour les pourcentages compris entre 60% et 70%. Le pourcentage de 60% a été choisi pour caractériser une gamme de dilution ; la dilution qui permet d'obtenir 60% de plants infectés est désignée sous le nom « Dilution ($p = 60$) ». Dans l'expérience étudiée, cette dilution est de $1/260$, et est comprise entre $1/438$ et $1/162$ avec une probabilité de 95%.

Selon la précision souhaitée, il est nécessaire de calculer la droite de régression corrigée, les limites de l'erreur, comparer 2 à 2 le parallélisme des droites puis les limites des dilutions qui donnent 60% de plants contaminés. Pour une précision moindre on peut estimer graphiquement la dilution ($p = 60$). Pour l'expérience de la figure 1, la dilution ($p = 60$) est estimée graphiquement à $1/240$. Dans les expériences qui suivent, cette détermination graphique est suffisante, en raison de la précision demandée.

Le calcul de l'estimation du maximum de vraisemblance impose diverses conditions matérielles :

— la variété utilisée doit être homogène. Elle doit pouvoir répondre à 100% aux fortes concentrations en

virus. Les variétés de maïs Planta, Dixie 22 ou INRA 258 et la variété de sorgho Tx 412 répondent à cette condition. D'autres variétés, de maïs notamment, ne donnent qu'un certain pourcentage de plants infectés et ne peuvent donc être utilisées.

— les essais sont comparatifs, ou relatifs à un témoin.

— il est nécessaire d'obtenir un nombre de points suffisants entre les pourcentages 10% et 90%. Il faut donc faire des dilutions de 2 en 2.

— un minimum d'effectifs d'au moins 20 plants de maïs par point est nécessaire. Pour avoir un nombre suffisant de dilutions utilisables, il faut prévoir une dizaine de dilutions dans une zone convenable. Si l'on choisit l'effectif minimum de 20 plants par dilution, il faut 200 plants par gamme de dilution. Une expérience ne comportant que deux traitements suppose au moins 400 plants. Il faut donc un très grand nombre de plants, ce qui est possible en utilisant le maïs ou le sorgho, plants qui peuvent être semés par pots de 5 ou 10. Dans la pratique, les extraits de feuilles sont dilués de $1/10$ à $1/2.560$. Pour les expériences portant sur du virus purifié, les suspensions sont préparées de manière à ce que la plus grande dilution corresponde à $0,5 \times 10^{-6}$ g/ml, limite du pouvoir infectieux.

Tableau IV

POUVOIR INFECTIEUX D'UN EXTRAIT VIROSE DE CANNE A SUCRE, ESTIME D'APRES LES RESULTATS DE L'INOCULATION D'UNE GAMME DE DILUTION DE L'EXTRAIT A DES MAIS, VAR. DIXIE 22

Dilution de l'extrait	Nombre de plants infectés sur le nombre de plants inoculés	Pourcentage	Limite de confiance du pourcentage à 0,05 %
1/10	127/127	100	
1/20	83/136	61	52-69
1/40	81/149	54	45-52
1/80	47/136	34	26-43
1/160	33/135	24	17-33
1/320	27/125	22	14-28
1/640	13/123	10	5-17
1/1280	2/122	1,6	1-2
1/2560	6/122	5	0-10
1/5120	6/129	5	0-11

Droite de régression : $y = 2,6013 + 1,006 \times$

Dilution ($p = 60$) : $\frac{1}{22} < \frac{1}{14} < \text{Dil.} (p = 60) < \frac{1}{37}$

COMPARAISON DES DEUX METHODES

Les deux méthodes sont très imprécises et ne permettent de comparer que de grandes variations de pouvoir infectieux. La détermination du DEP pose un problème pratique. Dans l'expérience rapportée tableau IV, le DEP n'est pas clairement défini. On peut l'estimer à 1/5.120. Si on n'avait que 20 plants par traitement, on l'aurait sans doute estimé à 1/640. Ceci est bien illustré par la forme de la courbe du pourcentage de plants infectés en fonction de la dilution (fig. 2). En dessous de 10 %, la courbe tend à s'infléchir vers l'axe des abscisses. L'estimation de la dilution ($p = 60$) est également approchée. Mais elle est basée sur les résultats d'infection de toute la gamme de dilution et en particulier sur les points les plus précis. De plus, il est possible que la gamme de dilution ne dépasse pas le point de dilution limite, ou que des maïs montrent des symptômes au-delà d'une dilution qui a donné des résultats négatifs. La détermination du point limite de dilution devient délicate ou impossible, alors que l'évaluation de la dilution ($p = 60$) est possible si on a un nombre de points suffisant entre 10 et 90 % d'infections.

MICROSCOPIE ELECTRONIQUE

Les préparations pour la microscopie électronique sont colorées négativement, selon la technique de BRENNER et HORNE (1959). Une goutte de matériel à observer, à une concentration de 0,2 à 0,5 mg/ml, est placée sur une grille support, recouverte d'un film de carbone. L'excès de liquide est enlevé avec un papier filtre, puis une goutte de formiate d'uranyle à 1 % est déposée, et laissée en contact une minute environ. Les échantillons sont examinés au microscope électronique Soplelem.

Les mesures des longueurs des particules virales, sur des préparations purifiées, sont faites sur des agrandissements photographiques de 20.000 avec un curvimètre gradué en millimètres. Les mesures ont été faites par deux opérateurs différents.

METHODES SEROLOGIQUES

Préparation des sérums.

Les sérums anti-SCMV-Ampefy ont été préparés par injection à des lapins de préparations purifiées de virus. Quatre injections à une semaine d'intervalle sont faites à chaque lapin, à raison de 3 mg environ de protéine virale par piqûre, additionnée (1 volume/2 volumes) d'adjuvant complet de FREUND. Les deux premières piqûres sont faites dans le coussinet plantaire des pattes arrière, les deux suivantes dans la cuisse. Si le titre du sérum paraît insuffisant après la quatrième piqûre, deux piqûres complémentaires sont faites, mais sans adjuvant de FREUND.

Une semaine après la dernière injection, les lapins sont saignés par ponction cardiaque. Après coagulation, le sérum est séparé du caillot par une centrifugation de 6.000 tr/mn pendant dix minutes.

Trois ou quatre lapins sont utilisés par série de préparation pour obtenir un lot de sérum suffisamment important. Le sérum est alors réparti en tubes de 1 ml au congélateur à -20° , ou mélangé volume à volume avec du glycérol.

Méthode du point de dilution maximale.

La réaction de précipitation antigène-anticorps en milieu liquide a été décrite par MATTHEWS (1957). Elle est faite en présence de tampon phosphate 0,01 M, Na Cl 0,9 %, pH 7,2. Elle permet de comparer des concentrations dans un rapport supérieur à 1 : 2. 0,5 ml d'une dilution déterminée d'anticorps sont mélangés à 0,5 ml d'une dilution d'antigène et maintenus à 37° ou 4° . Un précipité peut être observé après deux heures ou vingt-quatre heures respectivement.

Méthode de double diffusion en gélose.

La méthode de double diffusion en gélose mise au point par OUCHTERLONY (1958), est utilisée pour étudier la

pureté des extraits purifiés. Cette méthode permet de caractériser le MDMV (BOND et PIRONE, 1971), mais le virus doit être traité par éthanolamine. L'immunodiffusion est réalisée dans des boîtes de Pétri contenant 20 ml d'une solution de gélose à 0,6 %, tampon phosphate de sodium 0,01 M pH 7, azide de sodium à 0,05 %.

L'antigène et l'anticorps sont placés dans des trous effectués dans la gélose. Les boîtes sont ensuite placées dans une enceinte humide pour éviter la dessiccation.

L'antigène et l'anticorps diffusent dans la gélose et forment une ligne de précipitation au point de rencontre. Lorsque les réactifs sont présents dans les solutions initiales dans des proportions équivalentes, chaque ligne de précipitation agit comme une barrière immunospécifique pour un complexe antigène-anticorps donné, mais n'empêche pas la diffusion d'autres antigènes et d'autres anticorps non apparentés. Les lignes de précipitation sont observées à partir de quarante-huit heures et jusqu'à huit jours après le début de la diffusion.

Méthode d'agglutination passive.

BERCKS (1967) a montré que des particules de latex de 0,81 microns, sensibilisées par des anticorps ou des antigènes, peuvent flocculer spécifiquement si on les mélange à une suspension d'antigène ou d'anticorps correspondant. Le latex (B D Mérieux, 0,81 microns) est sensibilisé à partir de gamma globulines du sérum diluées de manière à ce que la quantité d'anticorps soit minimale.

Les gamma globulines de l'immunosérum utilisé sont partiellement purifiées par relargage avec du sulfate d'ammonium à 40 % de saturation. On recueille le précipité dans du soluté physiologique, puis on dialyse pour éliminer toute trace de sulfate d'ammonium. Après détermination de son titre en anticorps par la méthode de précipitation en milieu liquide, la solution de globulines est diluée, de manière à ce qu'elle garde un titre deux fois supérieur environ au titre limite.

Les gamma globulines sont incubées trente minutes à température ambiante avec du latex dilué à raison de un volume de latex pour un volume d'eau physiologique, latex auquel on ajoute du polyvinylpyrrolidone à 2×10^{-4} dans le but d'éviter l'agrégation des particules. Le latex est ensuite lavé dans un tampon tris-HCl 0,05 M pH 7,2 pour éliminer l'excès d'anticorps non fixés. On obtient ainsi du latex sensibilisé à l'immunsérum anti-SCMV, nommé Ls Iv, ou à un immunsérum de plant sain nommé Ls Is.

Les extraits de plantes à examiner sont préparés par broyage de feuilles de canne à sucre ou de maïs dans un tampon tris-EDTA 0,05 M pH 7,2 auquel on ajoute 0,1% de mercapto-éthanol pour éviter la dénaturation du virus, à raison de 2 ml de tampon par gramme de feuilles. Après clarification (5 mn. à 7.000 tr), les extraits sont dilués dans du tampon tris-HCl 0,05 M pH 7,2 additionné de polyvinylpyrrolidone à 2×10^{-4} .

Les dilutions d'antigènes sont distribuées dans les alvéoles d'une plaque de plexiglas, à raison de 0,1 ml d'antigène par alvéole, puis on ajoute 0,05 ml de latex. L'agglutination du latex est comparée au comportement de témoins : Ls Iv additionné d'extrait de plante saine, ou Ls Is et un extrait de plante virosée. Les plaques sont agitées par va-et-vient pendant dix minutes pour bien mélanger les réactifs, puis laissées au repos. Les agglutinations commencent après une demi-heure. Les observations se poursuivent durant deux heures.

Estimation de la quantité d'antigène viral dans les tissus foliaires.

LEBEURIER et HIRTH (1966) ont mis au point une technique de dosage de l'antigène viral dans des disques de feuilles de tabac. Cette technique consiste à évaluer la quantité de protéine totale présente dans le précipité spécifique et de reporter cette valeur sur une courbe étalon obtenue en précipitant des quantités connues de virus par le même immunsérum. Le dosage des protéines s'effectue par la méthode de FOLIN et CIOCALTEU (1927) modifiée par LOWRY, ROSEBROUGH et FARR (1951). On peut ainsi évaluer des quantités d'antigène viral variant de 10 à 120 microgrammes.

Les expériences préalables (cf. chap. II) ont montré que l'on n'observait pas de précipité avec des protéines normales de maïs, si l'on utilise un immunsérum dilué au 1/2 et un extrait virosé sommairement purifié, dilué au 1/2.

Pour les petites quantités, inférieures à 20 g de feuilles, les extraits virosés sont préparés par broyage des feuilles dans un mortier en présence de 2 ml

de tampon phosphate de sodium 0,01 M, NaCl 0,9 %, pH 7,0, mercapto-éthanol à 0,2% par gramme de feuilles, en présence de sable de Fontainebleau. Les quantités plus importantes de feuilles sont homogénéisées dans un broyeur à hélices avec la même quantité de tampon. Le broyat est filtré puis homogénéisé avec du chloroforme, à raison de un volume de chloroforme pour quatre volumes d'extrait. La suspension est alors centrifugée vingt minutes à 7.000 g. La phase aqueuse est utilisée pour évaluer la teneur en antigène viral.

Pour chaque lot d'immunsérum anti-SCMV-Ampefy, il faut établir une courbe étalon qui permettra d'évaluer la teneur en antigène viral d'extraits virosés préparés dans les mêmes conditions. Une gamme de concentration croissante, comprise entre 5 et 120×10^{-6} g d'une suspension purifiée de virus est préparée par dilutions dans un extrait dilué au 1/2, traité au chloroforme, de feuilles saines de maïs : 1 ml de chaque dilution est additionné de 0,3 ml d'immunsérum. Le mélange est laissé à 4° pendant vingt-quatre heures. Puis, le précipité

est lavé trois fois dans le tampon, et sa teneur en protéine est déterminée par la technique de LOWRY et al. (1951). Dans ce but, le précipité sérologique est dissout dans 1 ml de NaOH N/2, puis additionné des réactifs préparés dans l'eau distillée (et non dans la soude, selon la technique d'origine, pour maintenir un pH convenable et une molarité de NaOH de N/12 en fin de dosage).

La courbe étalon établie pour chaque sérum (fig. 3) permet de déterminer la teneur en antigène viral par ml d'extrait virosé. En raison de la teneur en antigène des plantes utilisées, aucune dilution n'est nécessaire pour lire sur la courbe étalon. Toutefois, quand un précipité sérologique peu abondant est attendu, 2 ml d'extrait sont mélangés à 0,6 ml d'immunsérum, pour obtenir une valeur proche de 10 gammas d'antigène.

La teneur en antigène viral est exprimée en gammas par ml, rapportée à la dilution 1 : 1, soit 1 ml de tampon par gramme de feuilles. La quantité d'antigène viral par gramme peut ensuite être obtenue par une règle de trois.

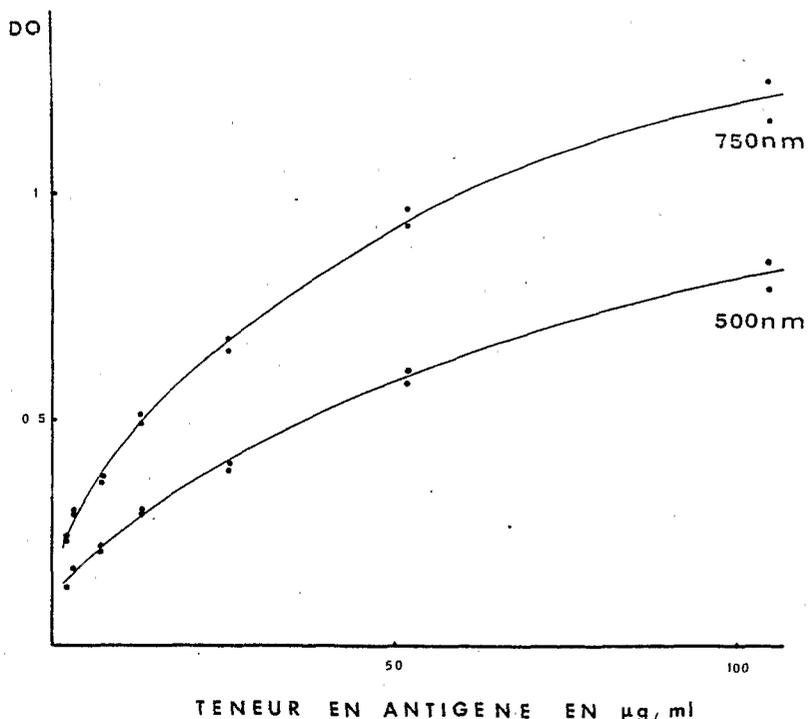


Fig. 3

Courbe étalon donnant la teneur en antigène viral en fonction de la D.O., obtenue par dosage selon la méthode de Lowry, à partir d'un immunsérum anti-SCMV-Ampefy. Les détails de préparation de l'extrait antigène à partir de feuilles de canne, maïs ou sorgho sont décrits dans le texte.

METHODES D'ANALYSES

Gradient de saccharose.

Les gradients de saccharose ont été préparés en coulant dans les tubes de centrifugeuse des solutions de sucre dans le tampon désiré de 10, 20, 30, 40 et 50% de sucre, à raison de 5, 7, 7, 7 et 4 ml. Les tubes sont placés une nuit au réfrigérateur pour obtenir le gradient, dont la linéarité est contrôlée au réfractomètre d'Abbe.

La suspension virale est placée sur le gradient, puis centrifugée dans un rotor Swing 25 à la Spinco L 50, trois heures à 23.000 tours. Pour recueillir les différentes fractions, le fond du tube est percé avec une seringue et le contenu est recueilli goutte à goutte dans une cuve de spectrophotomètre pour lecture en ultra-violet à 260 nm et 280 nm.

Electrophorèse de zone.

La méthode d'électrophorèse de zone a été décrite par VAN REGENMORTEL (1964). Le SCMV-Ampefy est repris dans 2 ml de tampon borate 0,1 M pH 8,6, saccharose à 45%, et est coloré au rouge phénol pour être placé dans l'appareil de Van Regenmortel. L'électrophorèse se poursuit pendant vingt heures en appliquant aux bornes de l'appareil une tension de 220 volts ; le redresseur de courant fournit alors 5-6 mA. La position des protéines virales est repérée par éclairage latéral sur fond noir. La valeur électrophorétique du virus $R\Phi$ est évaluée en mesurant la migration électrophorétique de celui-ci par rapport à celle du rouge phénol. Les différentes fractions de la colonne sont inoculées à du maïs, variété Dixie 22, pour étudier le pouvoir infectieux, le spectre est déterminé dans l'ultra-violet entre 220 et 320 nm.

Ultracentrifugation.

Les mesures des constantes de sédimentation ont été réalisées à l'aide d'une ultracentrifugeuse analytique Spinco, modèle E au Laboratoire des Virus des Plantes de l'Université de Strasbourg, par M. DANÉY de MARCILLAC.

Deux méthodes ont été utilisées :

- la méthode Schlieren, pour les suspensions virales,
- la méthode d'absorption en ultra-violet, pour les solutions d'ARN.

La constante de sédimentation S est fonction de la masse moléculaire. Elle est exprimée en unités Svedberg (10^{-13} secondes) et est ramenée par correction à la température de 20°, dans l'eau. Pour limiter les corrections, les coefficients de sédimentation

ont été déterminés dans des solutions salines très peu concentrées (phosphate 0,01 M). Le coefficient de sédimentation corrigé est désigné par le $S_{w 20}$.

Dosage du phosphore.

Le phosphore a été déterminé dans les solutions purifiées de virus par la technique de HORECKER et al. (1940) qui permet de doser de 1 à 10 gammas de phosphore.

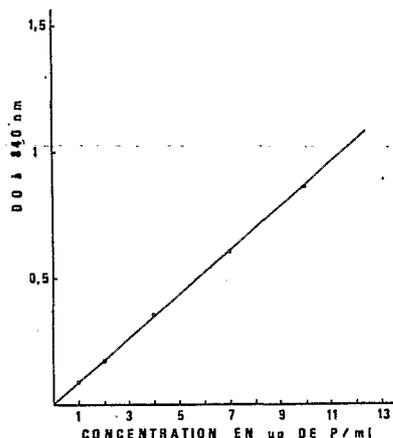


Fig. 4. — Courbe étalon du dosage du phosphore par la méthode de HORECKER, MA et HAAS (1940).

On trace la courbe étalon (fig. 4) obtenue avec une gamme de dilutions connues d'orthophosphate de sodium (RP), et cette courbe étalon sert à la détermination de la teneur en phosphore des solutions virales.

Dosage de l'azote.

Le dosage de l'azote dans la nucléoprotéine virale se fait selon la méthode de KJELDHAL.

Le mode opératoire est le suivant :

— Les échantillons de virus purifié, en solution dans du tampon phosphate 0,01 M pH 7,2 ou borate 0,05 M pH 8,6 sont minéralisés en présence de catalyseur et d'acide sulfurique (66° B) 0,5 ml, jusqu'à décoloration complète.

— On ajoute alors 10 ml de lessive de soude hyposulfite et on effectue la distillation. L'ammoniaque, déplacée par la soude, est recueillie à la sortie de l'appareil à distiller dans un bécher contenant de l'eau distillée colorée en rouge par quelques gouttes d'un mélange rouge de méthyle-bleu de méthylène. L'ammoniaque entraîne un virage du colorant en vert. Elle est neutralisée par l'addition, goutte à goutte, d'une solution d'acide sulfurique N/100 titrée.

Le calcul de l'azote contenu dans l'échantillon se fait sachant qu'un ml de SO_4H_2 N/100 correspond à 140 μ g d'azote.

Dosage de l'ARN.

La nature et la teneur en acide nucléique de SCMV-Ampefy ont été mises en évidence en utilisant la méthode de CERIOTTI (1955).

Le mode opératoire est le suivant :

— 1 ml d'eau (blanc) ou 1 ml de solution convenablement diluée de ribose (témoin) ou 1 ml d'extrait convenablement dilué, est ajouté à 7,5 ml de réactif à l'orcine.

— L'hydrolyse a lieu en plaçant les tubes au bain-marie bouillant quarante minutes.

— Les tubes sont alors refroidis sous l'eau courante froide, et leur densité optique mesurée immédiatement à 675 nm.

Partant du principe que l'hydrolyse des ribosides puriques est quantitative, et celle des bases pyrimidiques nulle (CERIOTTI, 1955), un facteur de conversion de 3,76 s'obtient pour le calcul du nombre de mg d'ARN à partir du ribose. La figure 5 montre la courbe étalon standard, obtenue avec des solutions de ribose.

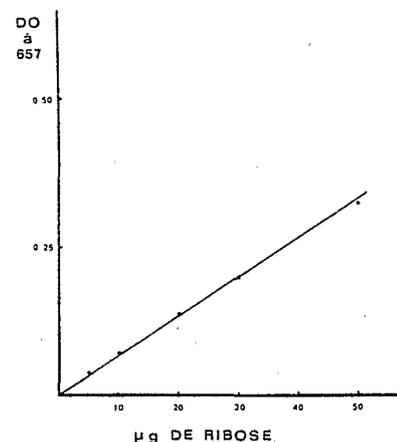


Fig. 5. — Courbe étalon du dosage du ribose, par la méthode de CERIOTTI (1955).

Analyse de la protéine de SCMV-Ampefy en gel de polyacrylamide.

Le poids moléculaire de la protéine de SCMV-Ampefy a été déterminé par électrophorèse en gel de polyacrylamide, d'après la méthode décrite par HEDRICK et SMITH (1968), mais en présence de dodécylsulfate de sodium (SDS) comme l'a décrite BALTZ (1972).

Cette méthode utilise une série de gels dont la concentration en acrylamide varie de 5% à 12%. Pour chaque concentration en acrylamide, la méthode suivie est celle de WEBER et OSBORN (1969).

PREPARATION DES REACTIFS

- tampon d'incubation :
tampon phosphate de Na 0,01 M
pH 7,1 SDS 1% ;
mercaptoéthanol 1% ;
- tampon de gel :
tampon phosphate de Na 0,2 M
pH 7,1 SDS 0,2% ;
- tampon d'électrophorèse :
tampon phosphate de Na 0,1 M
pH 7,1 SDS 0,1% ;
- solution d'acrylamide-méthylène bisacrylamide :

On dissout 33,3 g d'acrylamide et 0,9 g de méthylène bisacrylamide dans de l'eau distillée, et on complète à 100 ml. Cette solution est filtrée sur papier Whatman n° 1 pour éliminer tous

les produits insolubles. Cette solution est conservée à l'abri de la lumière à 4°.

- solution de persulfate d'ammonium :
On prépare juste avant l'emploi, une solution de 22,5 mg/ml dans le tampon d'électrophorèse dégazé.
- solution de charge :
Elle est formée de 0,025 ml de bleu de bromophénol à 5% additionné de 0,25 ml de mercaptoéthanol, 1 ml de glycérol, 1,25 ml de tampon d'électrophorèse.
- solution de coloration :
1,25 g de bleu de Coomassie sont dissous dans un mélange de 454 ml de méthanol à 50% et de 46 ml d'acide acétique glacial. Le colorant est filtré sur papier Whatman n° 1 pour l'élimination des produits insolubles.
- solution de décoloration :
On mélange 75 ml d'acide acétique glacial, 50 ml de méthanol et 875 ml d'eau distillée.

PREPARATION DES PROTEINES

Les protéines virales sont obtenues par dissociation de la solution de SCMV-Ampely dans le tampon d'incubation, et chauffage au bain-marie bouillant pendant deux minutes.

Les protéines témoins subissent le même traitement.

PREPARATION DES GELS

- préparation des différentes solutions d'acrylamide :
On part d'une solution mère à 15% en acrylamide. Elle s'obtient en mélangeant 27 ml de la solution acrylamide-bisacrylamide, 30 ml de tampon de gel, 2,85 ml d'eau distillée.

Le mélange est mis à dégazer. Puis on ajoute 150 µl de N N N' N' tétraméthylènediamine.

Les solutions à concentration voulue en acrylamide sont obtenues en diluant la solution mère avec le tampon d'électrophorèse dégazé. Avant de couler le gel, on ajoute le volume nécessaire de la solution de persulfate d'ammonium préparée extemporanément. Le tableau V indique les proportions employées.

Tableau V

Concentration (en %) d'acrylamide dans les gels	5	6	7	8	9	10	12
Volume de la solution à 15% en acrylamide (en ml).	5	6	7	8	9	10	12
Volume de tampon d'électrophorèse (en ml)	9,5	8,4	7,3	6,2	5,1	4	1,8
Volume de la solution de persulfate (en ml)	0,5	0,6	0,7	0,8	0,9	1	1,2

- préparation des gels :
On coule rapidement chaque solution dans des tubes en verre bien secs, fermés à leur extrémité inférieure par du parafilm. On coule 3,5 ml par tube de 10 x 0,6 cm.

Avant le début de la polymérisation, on dépose à la pipette Pasteur une goutte d'eau distillée à la surface du gel, afin que celle-ci soit bien plane, et que la polymérisation ait lieu en l'absence d'oxygène.

On laisse la polymérisation se poursuivre pendant quarante minutes, puis on enlève le parafilm.

ELECTROPHORESE

Les tubes sont placés dans l'appareil à électrophorèse, constitué de deux bacs superposés. Le bac inférieur contient du tampon d'électrophorèse. L'anode est dans le bac inférieur.

Les échantillons de protéine (10 à 20 µg par tube) sont mélangés avec

la solution de charge dans la proportion de 3 pour 1 en volume, et déposés sur les gels à la micropipette. Le sommet des tubes est alors rempli de tampon d'électrophorèse, de même que le bac supérieur, et le début de l'électrophorèse s'effectue avec un courant de 25 mA. Lorsque le bleu de bromophénol a entièrement pénétré dans les gels, le courant est alors amené à 50 mA, soit 6 mA par tube.

L'électrophorèse est arrêtée lorsque le colorant est proche du bac inférieur.

COLORATION ET DECOLORATION

Les gels sont extraits des tubes à l'aide d'une seringue terminée par un embout de caoutchouc s'adaptant sur le tube. Ils sont alors placés deux heures à 30° dans la solution de coloration.

La décoloration s'effectue avec de fréquents lavages. Au bout d'une douzaine d'heures, les bandes correspondant aux protéines apparaissent, mais la décoloration prend plusieurs jours.

Après décoloration, les gels sont conservés dans une solution d'acide acétique à 7,5%.

Analyse de l'ARN en gel de polyacrylamide à 2,4%.

L'analyse de l'ARN se réalise suivant la technique de LOENIG (1969), comme l'a décrite PINCK (1972).

REACTIFS

- tampon de base :
Tris 0,4 M, acétate de Na 0,2 M, EDTA 0,02 M ajusté à pH 7,4 à l'acide acétique.
- tampon d'électrophorèse :
tampon de base dilué 10 fois.
- solution d'acrylamide :
dissociation à 40° dans l'eau distillée d'acrylamide à 20% et de méthylène bisacrylamide à 1%. La filtration sur millipore (0,8 µ) élimine les produits insolubles. La solution se conserve à l'obscurité à 4°.

PREPARATION DES GELS

La solution de polymérisation se prépare en ajoutant :

- 1,2 ml de solution d'acrylamide,
- 1 ml de tampon de base,
- 7,7 ml d'eau distillée.

Après agitation, le mélange est dégazé sous vide, et on ajoute les catalyseurs :

- 7 μ l de N N N' N' tétraméthylène-diamine,
- 70 μ l d'une solution de persulfate d'ammonium à 10 %, préparée extemporanément.

Le mélange est rapidement coulé dans des tubes de plexiglas de dimensions 1 cm X 10 cm, à raison de 6 ml par tube. Les tubes ont été préalablement garnis à leur extrémité inférieure de parafilm. Pour que la surface du gel soit plane, on ajoute avant la polymérisation une goutte d'eau distillée dégazée sur la surface du gel. On attend alors quinze minutes.

PRE-ELECTROPHORESE

On lave délicatement la surface des gels à l'eau distillée. On élimine alors l'excès d'eau par un morceau de papier filtre, puis on enlève le parafilm qui bouche l'extrémité inférieure des tubes. On remplace le parafilm par un morceau de tissu nylon, que l'on maintient à l'aide d'un élastique. On fixe les tubes en position verticale à la cuve supérieure de l'appareil à élec-

trophorèse qu'on remplit de tampon d'électrophorèse. On soumet alors les gels à une pré-électrophorèse de quarante-cinq minutes à température ambiante, sous un courant de 5 mA par tube. L'anode se trouve dans la cuve inférieure.

ELECTROPHORESE

Les tubes restent en place. On dépose à la micropipette les échantillons d'ARN au contact des gels. L'ARN est en solution dans le tampon d'électrophorèse, et à une concentration telle que 150 μ g d'ARN au maximum soient contenus dans 20 à 50 μ l maximum. Du glycérol est ajouté à la solution d'ARN dans une proportion de 20 % pour que la solution forme un dépôt homogène à la surface du gel. La coloration de la solution au bleu de bromophénol permet de suivre le déroulement de l'électrophorèse qui dure quatre heures à 4°, avec un courant de 8 mA par tube.

LECTURE DES GELS

Les gels sont extraits délicatement des tubes, puis fixés à l'acide acétique M durant dix minutes en tubes à essais.

Les gels sont ensuite colorés avec une solution de bleu de méthylène à 0,2 % dans du tampon acétate de Na à pH 4,7 durant une heure.

La décoloration se fait dans de l'acide acétique M, par électrophorèse.

L'anode est placée dans la cuve supérieure de l'appareil, et on fait passer le courant de 10 mA par gel durant deux heures.

Dosage du tryptophane.

Le tryptophane étant détruit par l'hydrolyse nécessaire au dosage des acides aminés de la protéine virale, sa teneur doit être déterminée indépendamment des autres acides aminés. On utilise la méthode de PORTNER et HOGL (1952).

SOLUTIONS

— p. DAB dans l'acide sulfurique 2 N, à raison de 30 mg/ml. On en prépare 25 ml. La conservation du produit ne dépasse pas quarante-huit heures.

— solution de nitrite de Na à 1 % dans l'eau. Avant l'emploi, on dilue le nitrite de Na dans le rapport de 1 à 25.

— acide sulfurique 23,8 N. Un litre de cette solution contient 665 ml d'acide sulfurique à 95 %.

— acide sulfurique 2 N.

— soude 0,1 N.

— tryptophane : 100 mg dans un litre de NaOH 0,1 N.

— essai : on met environ 3 à 5 mg de protéine en solution dans NaOH 0,1 N, car il faut 1 mg dans 0,3 ml de NaOH 0,1 N.

Tableau VI

PREPARATION DU DOSAGE

Solutions	Tubes				Blanc 1 Blanc 2	Essai 1 (1 mg)	Essai 2 (3 mg)
	1 et 1'	2 et 2'	3 et 3'	4 et 4'			
Acide sulfurique 23,8 N	8 ml	8 ml	8 ml				
p. DAB	1 ml	1 ml	1 ml	1 ml	—	1 ml	1 ml
Acide sulfurique 2 N	—	—	—	—	1 ml	—	—
Tryptophane	0,25 ml	0,5 ml	0,75 ml	1 ml	—	protéine 0,3 ml	protéine 0,9 ml
NaOH 0,1 N	0,75 ml	0,5 ml	0,25 ml	—	—	0,7 ml	0,1 ml

On met les tubes une heure à l'obscurité à température ambiante. On ajoute alors dans chaque tube 1 ml de nitrite de sodium.

Au bout de trente minutes, la coloration bleue est à son maximum.

DESCRIPTION DE LA METHODE

On introduit dans un erlenmeyer de 25 ml 8 ml d'acide sulfurique 23,8 N et 1 ml de p. DAB.

On refroidit alors le mélange à 25°.

On ajoute alors la solution à étudier, on agite et on met à l'obscurité une heure à 25°. Il y a formation d'un complexe tryptophane-aldéhyde.

On introduit alors 0,1 ml de nitrite de sodium. On agite. La coloration bleue apparaît. Au bout de trente minutes à 25°, la lecture se fait à 619 nm.

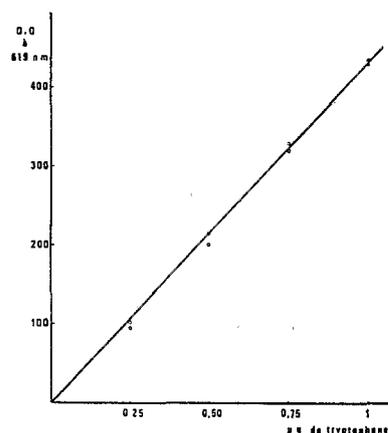


Fig. 6. — Courbe étalon de la teneur en tryptophane selon la technique de PORTNER et HOGL (1952).

La figure 6 donne la courbe étalon de la teneur en tryptophane en fonction de la D.O. à cette longueur d'onde.

Dosage des acides aminés.

HYDROLYSE CHLORHYDRIQUE

Un échantillon de SCMV-Ampéf, correspondant à environ 0,1 μ mole de protéine est hydrolysé dans 0,5 ml de HCl 6 N à 108° pendant vingt-quatre, quarante-huit, soixante-douze et cent vingt heures, soit 0,3 ml d'échantillon de départ.

DOSAGE QUANTITATIF

Le dosage quantitatif des acides aminés est effectué sur l'appareil automatique Technicon, par M^{me} PETER, au Laboratoire de Physiologie Végétale de l'Université Louis-Pasteur de Strasbourg.

RESULTATS

CHAPITRE I

LE VIRUS

I. — PURIFICATION DE SCMV-AMPEFY

Quand ce travail a été entrepris, cinq méthodes de purification de SCMV avaient été proposées :

— Purification de SCMV-H (PIRONE et ANZALONE, 1966). Cette méthode a permis de photographier le virus sur des préparations infectieuses, mais très agrégées.

— Purification du MDMV (SHEPHERD, 1965 ; BANCROFT et al., 1966 ; VON WECHMAR et HAHN, 1967 ; SEHGAL, 1968).

L'application de ces méthodes de purification à la souche étudiée n'a pas donné de résultats corrects en raison de :

— la forte agrégation des préparations purifiées, allant jusqu'à l'insolubilité en cours de travail.

— absence de spectre caractéristique.

— préparation hétérogène au microscope électronique, comportant de nombreux débris, particules virales fragmentées et agrégées.

— peu ou pas de pouvoir infectieux.

Une méthode plus adaptée à la souche locale de SCMV a donc dû être mise au point. Cette technique de purification a été établie en contrôlant à chaque étape :

— le pouvoir infectieux, par la recherche du point de dilution maximum.

— le spectre en lumière ultra-violette.

— l'état d'agrégation, par observation de la densité optique à 310 nm.

— le rendement final en virions, fonction de la valeur de la densité optique à 260 nm.

Choix du matériel végétal.

La canne à sucre présente quelques inconvénients en vue de la purification du virus :

— c'est une plante à multiplication végétative, qui peut donc être hôte d'autres parasites systémiques,

— les feuilles, riches en fibres et en sclérenchyme, sont très difficiles à broyer.

C'est pourquoi les diverses techniques de préparation décrites dans la littérature utilisent comme matériel végétal de départ le maïs ou le sorgho.

— Le maïs peut être obtenu par semis. Les feuilles sont plus faciles à broyer que les feuilles de canne à sucre. Il pousse plus ou moins rapidement en toute saison en serres à Tananarive. Mais, le rendement obtenu à partir des variétés très sensibles Dixie 22 ou INRA 258 a toujours été faible.

— Le sorgho, variété Tx 412, présente les mêmes avantages que le maïs, mais les teneurs en virus n'y sont pas plus élevées. D'autres variétés de sorghos se nécrosent rapidement sous l'action de l'infection (cf. chap. III) et sont impropres à la purification du virus.

— La plupart des graminées sauvages se multiplient par voie végétative comme la canne à sucre, et ne présentent donc pas d'avantages supplémentaires.

Toutefois, malgré les inconvénients cités plus haut, la canne à sucre ayant donné les rendements les plus élevés, nous a paru le meilleur matériel végétal pour purifier la souche SCMV-Ampefy. Ceci semble confirmé par les teneurs relatives en antigène viral de la canne à sucre, du maïs et du sorgho (cf. chap. IV).

Extraction et tampon de broyage.

Les feuilles de canne à sucre sont finement découpées en lanières de 1 mm de large dans le sens transversal avant d'être broyées au mortier, ou d'être mélangées au tampon dans un broyeur-mixeur Sorvall.

Le broyage doit se faire en présence d'anti-oxydant. Deux anti-oxydants ont été utilisés : SO_2Na_2 (PIRONE et ANZALONE, 1966), et le mercaptoéthanol à 0,1 % (SHEPHERD, 1965).

L'addition de mercaptoéthanol à 0,2 % s'est révélée indispensable pour obtenir du virus correctement purifié.

Divers tampons ou milieux de broyage ont été essayés :

— tampon citrate 0,5 M, utilisé pour le MDMV-A (SHEPHERD, 1965 ; BANCROFT et al., 1966),

— tampon phosphate 0,05 M ou 0,5 M, utilisé pour une souche de SCMV en Afrique du Sud (VON WECHMAR et HAHN, 1967).

— tampon tris-EDTA 0,05 M pH 7,2, qui a un rôle désagrégant sur le virus X de la pomme de terre (REICHMANN, 1959).

Le milieu d'extraction au citrate n'a pas permis d'obtenir de préparation virale infectieuse. Le tampon phosphate permet d'obtenir des préparations très infectieuses, mais le spectre

final présente un rapport des densités optiques 260 nm/280 nm de 1,5, ce qui ne correspond pas au rapport d'un virus filamenteux : des nucléoprotéines non virales persistent jusqu'en fin de purification. Le tampon borate permet d'obtenir des préparations concentrées infectieuses, mais la forte diffusion de la lumière ne permet pas d'observer de spectre en lumière ultra-violette. Le virus est donc probablement très agrégé. Le tampon tris-EDTA a donné les meilleures préparations. L'EDTA doit permettre de détruire la structure des ribosomes qui sédimement avec les particules virales et il agit comme agent chélateur. Le pouvoir tampon du tris-EDTA 0,05 M est faible et il n'est pas souhaitable de diminuer la molarité lors du broyage et de la clarification.

Clarification.

Divers agents de clarification ont été utilisés :

— précipitation des protéines hôtes à pH 4,7. Cette technique a été utilisée pour purifier la souche SCMV-H (PIRONE et ANZALONE, 1966). Ce pH correspond au maximum de précipitation de la protéine virale de SCMV-Ampefy (cf. chap. II, III), et le virus sédimement à ce pH en même temps que les protéines de l'hôte.

— précipitation des protéines hôtes à pH 5,3. Le MDMV a été préparé après clarification à ce pH (SEHGAL, 1968), mais la souche SCMV-Ampefy s'agrége déjà à ce pH.

— adsorption par le phosphate de calcium. Cette technique a été utilisée récemment pour le MDMV-B (LANGENBERG, 1973). Toutefois elle n'a pu être appliquée intégralement à SCMV-Ampefy pour des raisons matérielles. En utilisant un tampon sans détergent, le triton, on obtient des préparations très agrégées avec la souche SCMV-Ampefy.

— clarification par le chloroforme. Les autres techniques de clarification de SCMV ou de MDMV utilisent le chloroforme, soit volume à volume (SHEPHERD, 1965), soit dans la proportion de 1 à 10 (VON WECHMAR et HAHN, 1967). Les préparations les moins agrégées ont été obtenues en ne dépassant pas une concentration de 1 volume de chloroforme pour 4 volumes d'extrait.

Centrifugation différentielle et tampon de suspension.

Les extraits bruts obtenus doivent être concentrés. En raison du grand volume d'extrait, le virus est sédimement dans un rotor (Spinco Beckman) R 21, trois heures à 40.000 g.

La nature du tampon dans lequel les culots sont repris présente une grande importance pour la conservation du pouvoir infectieux et pour éviter l'agrégation. Le tampon tris-EDTA 0,005 M pH 7,2 a été choisi en raison de l'utilisation de la chromatographie sur colonne d'agarose : la diminution de la molarité est utilisée pour limiter les risques d'agrégation du virus et pour permettre la spectrophotométrie, l'EDTA absorbant dans l'ultra-violet. Cet abaissement de la molarité a déjà été signalé comme très favorable pour prévenir l'agrégation du virus X de la pomme de terre (REICHMANN, 1959). Par contre, le virus s'agrège dans l'eau distillée.

Chromatographie d'exclusion d'un gel d'agarose BIO RAD 15 M.

L'exclusion d'une colonne de gel est considérée comme le traitement le plus doux pour des virus allongés et peu stables (VAN REGENMORTEL, BRANDES et BERCKS, 1962). Le virus est exclu d'une colonne d'agarose BIO RAD 15 M. Toutes les fractions infectieuses se trouvent dans le premier pic observé (fig. 6 : pic a). Les fractions de ce pic sont fortement biréfringentes. Puis, s'écoulent des fractions présentant un spectre de nucléoprotéine. (Pic b), enfin des fractions contenant pigments et protéines normales de la plante (pic c). Les fractions du premier pic présentent un spectre de nucléoprotéine, avec un rapport des D.O. 260 nm/280 nm variant entre 1,16 et 1,21.

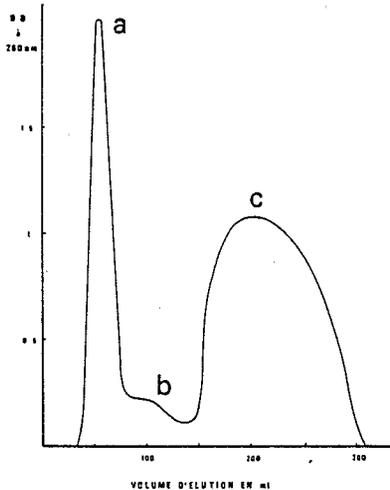


Fig. 6. — Profil d'éluion d'extrait de feuilles de canne à sucre virosée sur une colonne d'agarose BIO RAD 15 M. Tampon d'éluion : Tris-EDTA 0,005 M pH 7,2.

Les techniques de purification du MDMV sont basées sur l'utilisation d'un gradient de saccharose. Après

clarification au chloroforme, un extrait brut de feuilles de cannes virosées a été séparé en deux parties : l'une a été centrifugée en présence d'un gradient de saccharose, l'autre a été exclue d'une colonne de gel d'agarose. Les résultats montrent que la séparation sur la colonne d'agarose est plus nette, le premier pic étant plus facile à récolter que dans le cas du gradient de saccharose. La quantité globale de virus obtenue à la fin du gradient de saccharose est équivalente à celle obtenue par la colonne d'agarose. Les spectres d'absorption en lumière ultra-violettes montrent le même taux d'agrégation dû à l'emploi du tampon de broyage borate-EDTA, selon la méthode de purification de BOND et PIRONE (1971).

Ultracentrifugations différentielles.

La seconde ultracentrifugation permet de séparer un culot d'un surnageant qui a un spectre de nucléoprotéine avec un rapport des D.O. 260 nm/280 nm supérieur à 1,30. Le culot peut être repris dans divers tampons : phosphate 0,05 M pH 7,2 ; borate 0,05 M pH 8,6 ou tris-EDTA 0,005 M pH 7,2.

Après remise en suspension du culot, on observe un spectre de nucléoprotéine, avec un rapport des D.O. 260 nm/280 nm de 1,20 quel que soit le tampon choisi parmi les trois précédents. Ces suspensions sont toutes infectieuses.

La deuxième ultracentrifugation est donc indispensable puisqu'elle permet de séparer le virus d'une nucléoprotéine exclue en même temps que lui de la colonne d'agarose. Elle ne paraît pas augmenter de manière sensible l'agrégation du virus.

Poursuite de la purification.

ULTRACENTRIFUGATION

Un nouveau cycle d'ultracentrifugation entraîne une forte agrégation du virus.

GRADIENT DE SACCHAROSE

Une préparation virale purifiée, contenant 7 mg de virus a été soumise à un gradient de saccharose (trois heures à 25.000 tr/mn). On observe une seule bande à 3,5 cm du sommet du tube, correspondant à une densité en sucre de 21 %.

Dans cette bande, on obtient un spectre aux ultra-violettes de nucléoprotéine présentant une valeur du rapport des D.O. 260 nm/280 nm de 1,17. La comparaison des densités optiques des préparations virales montre que la perte en virus est importante : elle correspond aux trois quarts du matériel de départ.

ELECTROPHORESE DE ZONE

Après la deuxième ultracentrifugation, 4,6 mg de virus ont été repris dans 2 ml de tampon borate de POLSON pour être soumis à une électrophorèse de zone, selon la technique décrite par VAN REGENMORTEL (1964). On obtient une bande de protéine, dont le rapport électrophorétique a été selon les expériences, de 0,17-0,18 et 0,21.

Si l'on étudie la densité optique à 260 nm, on observe deux pics : l'un correspond à la zone de diffusion de la lumière, l'autre est proche du rouge phénol. Après une dialyse contre le même tampon pour éliminer le sucre, on observe un spectre dont le rapport des D.O. 260 nm/280 nm est de 0,89, ce qui correspond à une nucléoprotéine très pauvre en ARN. Par contre, le second pic présente après dialyse un spectre de nucléoprotéine riche en ARN (rapport de 1,55). Aucune fraction de la colonne d'électrophorèse de zone n'a montré de pouvoir infectieux.

DISCUSSION

Il nous a paru difficile de poursuivre la purification après la deuxième ultracentrifugation, le virus étant très fragile. Les trois techniques utilisées ont entraîné, soit l'agrégation du virus, soit des pertes importantes qui ne semblent pas dues à l'élimination d'impuretés, soit la destruction de la molécule virale.

De semblables observations ont été faites par d'autres chercheurs qui ont observé que l'augmentation du nombre des ultracentrifugations provoque l'agrégation du virus (PIRONE et ANZALONE, 1966 ; GILLASPIE, 1972). Toutes les techniques de purification du MDMV ou de SCMV ne comportent que deux ultracentrifugations, dont un gradient. La technique que nous avons utilisée permet, en remplaçant un gradient de saccharose par une chromatographie sur colonne de gel d'agarose, de faire une ultracentrifugation supplémentaire.

Le rapport électrophorétique $R\Phi$, obtenu par électrophorèse de zone est du même ordre que celui de 0,21 signalé par VON WECHMAR et HAHN (1967) pour une souche de SCMV d'Afrique du Sud. Le virus paraît se dissocier en ARN et protéine. L'électrophorèse provoque un échauffement des préparations atteignant 30°, qui peut provoquer la dégradation virale.

Application de la méthode à un extrait de canne saine.

Des extraits préparés à partir de canne saine permettent également d'obtenir un pic après chromatographie d'exclusion sur gel d'agarose (fig. 7). Les fractions obtenues ne

sont pas infectieuses, ce qui élimine le risque d'infection latente dans les cannes utilisées. On observe à l'ultra-violet un spectre de nucléoprotéine dont le rapport des D.O. 260 nm/280 nm est de 1,35 à 1,60. Ce pic (fig. 7) est beaucoup moins important que le pic des fractions contenant les particules virales.

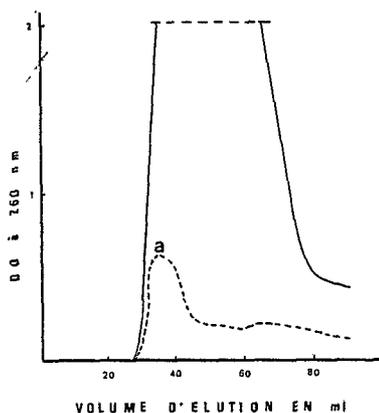


Fig. 7. — Profil d'éluion d'extraits de feuilles de canne à sucre, sur une colonne d'agarose BIO RAD 15 M.

— en tiré : extrait de feuilles saines,
— en trait plein : extrait de feuilles virosées de même concentration.

Après la deuxième ultracentrifugation, on observe un petit culot brunâtre qui absorbe dans l'ultra-violet, mais sans donner de spectre, et avec une forte diffusion de la lumière. Il s'agit probablement de protéines agrégées. Par spectrophotométrie, on peut essayer d'estimer quantitativement ces protéines. Pour obtenir une transmission de lumière en spectrophotométrie, on doit reprendre le culot des protéines normales obtenues à partir de 500 g de feuilles dans 3 à 5 ml. Les préparations virales correspondant à la même quantité de feuilles sont recueillies dans 4 à 6 ml et doivent être diluées au 1/20 ou 1/30, soit dans 80 à 180 ml. En prenant le maximum de dilution obtenue avec les protéines normales et le minimum de dilution avec les préparations virales, on obtient un rapport de 1 à 15. Dans le plus mauvais cas, la spectrophotométrie d'une préparation virale peut être entachée d'une erreur de 1/15, sans tenir compte du fait que l'absorption dans l'ultra-violet des protéines normales est due principalement à la diffusion de la lumière, c'est-à-dire à l'agrégation des protéines et non à leur concentration (fig. 8).

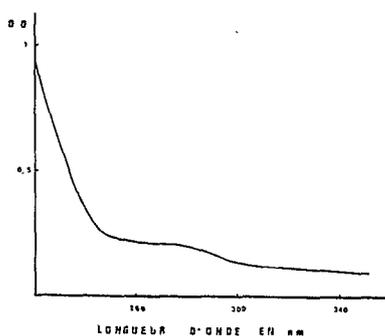


Fig. 8. — Absorption en lumière U.V. d'une suspension obtenue à partir du culot de la deuxième ultracentrifugation d'un extrait de feuilles de canne à sucre saine.

Conclusion.

Notre méthode de purification, résumée au tableau VII* a permis d'obtenir une nucléoprotéine infectieuse qui présente un spectre caractéristique, avec un rapport des D.O. 260 nm/280 nm de 1,20, ce qui laisse supposer que ce virus, comme la majorité des virus à symétrie hélicoïdale connus, tels le VMT, doit contenir environ 5% de ARN et peu d'acides aminés aromatiques.

La méthode utilisée se différencie des autres méthodes de purification principalement par :

— l'emploi de tampon tris-DTA : le rôle chélateur de l'EDTA permet une purification plus poussée,

— le contrôle du pH qui ne descend jamais en dessous de 6 nous a permis d'obtenir les préparations les plus infectieuses,

— les techniques de purification de SCMV et de MDMV comportent une ultracentrifugation différentielle et un gradient de saccharose. Les virus s'agrègent avec une ultracentrifugation supplémentaire (GILLASPIE, 1972). L'emploi de chromatographie sur colonne de gel d'agarose évite l'ultracentrifugation contre un gradient de saccharose. Il est encore possible de faire une ultracentrifugation différentielle supplémentaire avant que le virus ne s'agrège.

Le rendement obtenu, déterminé par la D.O. à 260 nm (cf. § III) est de l'ordre de 10 à 15 mg de virus purifié par kg de feuilles de canne à sucre. Ce rendement est relativement élevé par rapport à celui obtenu lors de la purification de MDMV-B, qui est de

* V. page 80.

l'ordre de 2 à 3 mg par kg de tissus infectés (HILL, FORD et BENNER, 1973), ou de 8 mg (TOSIC et al, 1974).

La tendance actuelle des phytopathologistes est de mettre au point une méthode de purification unique pour l'ensemble des souches de SCMV et de MDMV (GILLASPIE, 1972 ; TOSIC et al., 1974). Ces derniers auteurs, qui estiment que le trop grand nombre de méthodes de purification empêche les études comparatives, oublient que les souches déjà décrites peuvent avoir des propriétés biochimiques différentes qui imposent des techniques particulières de purification. Par exemple, la méthode de TOSIC et al. (1974), qui utilise l'acidification des extraits de plantes pour la clarification, ne convient pas à SCMV-Ampefy. A l'inverse, SNAZELLE, BANCROFT et ULLSTRUP (1971) considèrent à juste titre que le SCMV et le MDMV constituent un grand ensemble de virus allongés, mais composé de nombreuses souches qui nécessitent des techniques de purification différentes.

II. MICROSCOPIE ELECTRONIQUE

Au microscope électronique, les préparations purifiées de SCMV-Ampefy montrent de longs bâtonnets très flexueux (fig. 9). Cet aspect est caractéristique des virus du groupe potyvirus (HARRISON et al., 1971). Les préparations montrent de nombreux fragments et quelques filaments paraissant agrégés bout à bout.

L'histogramme de distribution des longueurs a été établi à partir de 600 particules obtenues après un gradient de saccharose (fig. 10). On observe une longueur préférentielle de 750 nm sur 20 % des particules. 40 % des particules ont une longueur comprise entre 720 nm et 780 nm. Le diamètre de la particule est de l'ordre de 14 nm.

La structure du virus reste confuse sur les photographies. Par des études de diffraction optique, selon la technique de KLUG et BERGER (1964), J. WITZ (Communication personnelle) a déterminé une longueur du pas de l'hélice de 3,4 nm.

Le SCMV-Ampefy présente la même longueur préférentielle de 750 nm que celle rapportée pour toutes les souches connues de SCMV (DIJKSTRA et GRANCINI, 1960 ; HEROLD et WEIBEL, 1963 ; PIRONE et ANZALONE, 1966 ; VON WECHMAR et HAHN, 1967), ainsi que pour les souches de MDMV (SHEPHERD, 1965 ; BANCROFT et al., 1966). La longueur est inférieure à celle de

784 ± 10 nm d'une souche de SCMV isolée du sorgho par VON WECHMAR et HAHN (1967). La longueur de 750 nm

est caractéristique du groupe potyvirus (HARRISON et al., 1971). Le pas de l'hélice de SCMV-Ampefy est con-

cordant avec les résultats obtenus pour trois autres virus du groupe potyvirus par VARMA et al. (1968).

Tableau VII
PURIFICATION DE SCMV-AMPEFY

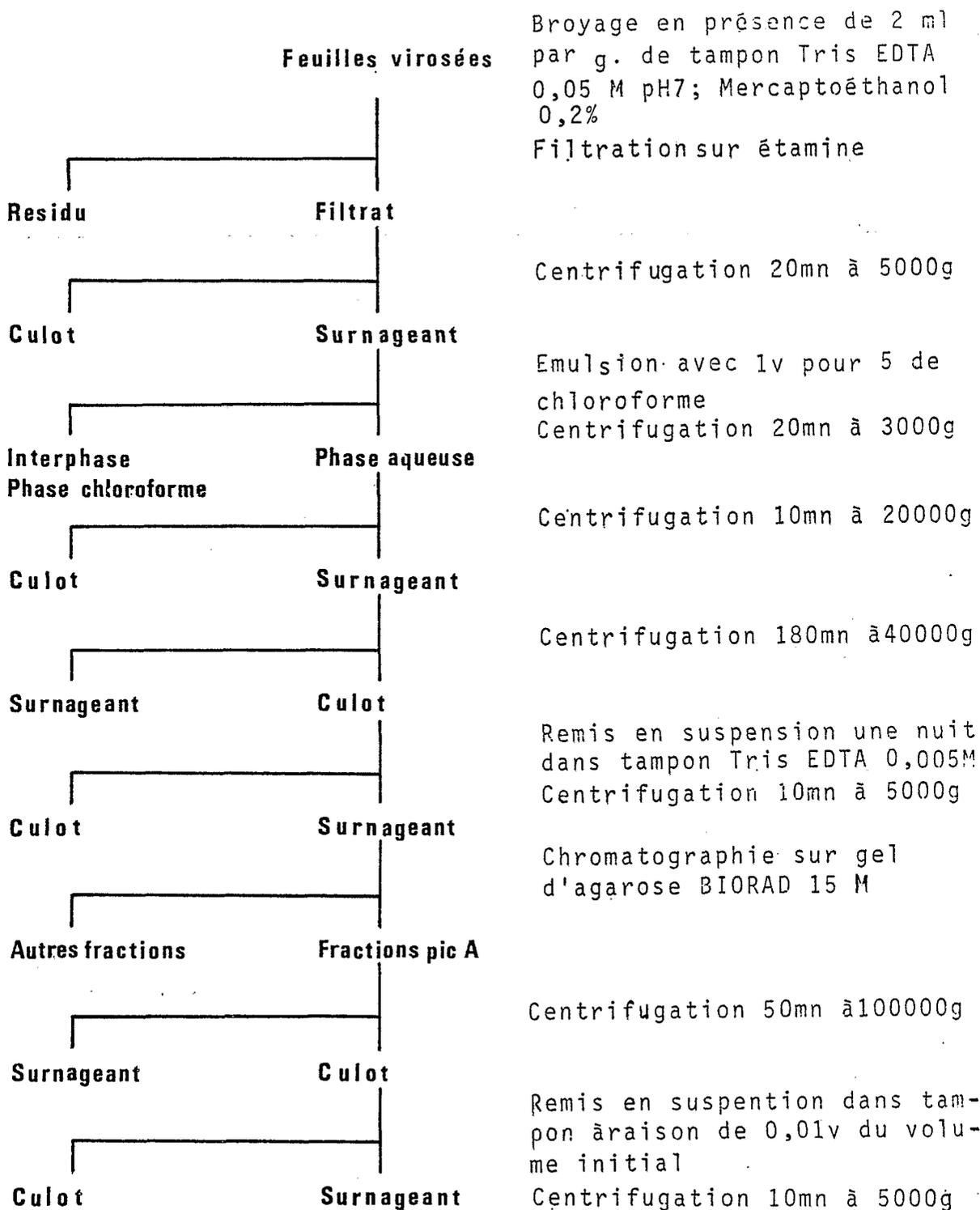




Fig. 9. — Aspect au microscope électronique d'une préparation purifiée de SCMV-Ampefy. Grandissement : 60.000.

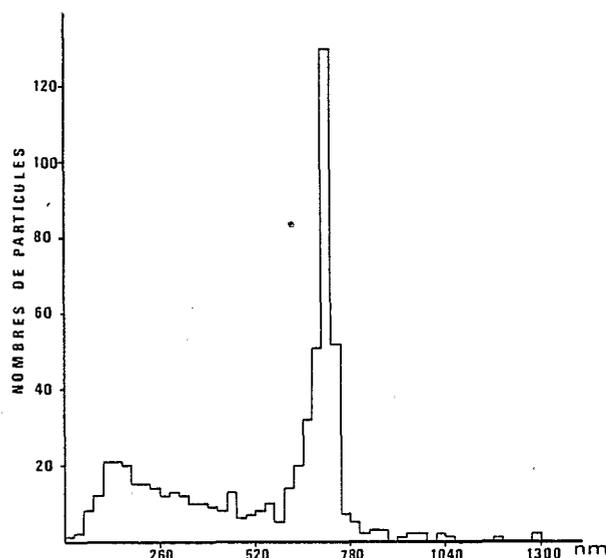


Fig. 10. — Histogramme de longueur des particules de SCMV-Ampefy, établi à partir d'une préparation purifiée.

III. PROPRIETES PHYSICO-CHIMIQUES DU VIRUS PURIFIE

Ultracentrifugation analytique.

L'analyse des profils de sédimentation permet de vérifier la pureté et le degré d'homogénéité d'un virus. Sur la figure 11, on observe un seul pic de sédimentation qui correspond à un $S_{w,20}$ de 151 dans un tampon borate 0,01 M pH 8,6. Cette valeur est proche de celle donnée pour la souche américaine de SCMV-A, qui est de 155 S (BANCROFT et al., 1966), ainsi que de celle du MDMV déterminée par SEHGAL (1968), qui est de 148 S. Par contre, elle est inférieure à d'autres déterminations du MDMV, comme celle de SHEPHERD (1965) ou de LANGENBERG (1973) où le S est de 167 ± 6 .

Spectrophotométrie et teneurs du virus en ARN, N et p.

LE SPECTRE

Le virus purifié a un spectre caractéristique de nucléoprotéine (fig. 12). Il présente un large maximum entre

260 nm et 265 nm, et un minimum à 247 nm. Le rapport des densités optiques à 260 nm et 280 nm, soit D.O. 260/D.O. 280 est de $1,20 \pm 0,02$. Le rapport maximum/minimum, soit D.O. 260/D.O. 247 est de $1,15 \pm 0,02$.

En faisant le spectre entre 300 nm et 280 nm au demi nm près, on observe un épaulement à 290 nm, épaulement dû à la présence de tyrosine et de tryptophane dans la protéine, comme c'est le cas pour le MDMV (GORDON et GINGERY, 1973; LANGENBERG, 1973; HILL, FORD et BENER, 1973).

Le virus diffuse fortement la lumière à 320 nm.

COEFFICIENT D'EXTINCTION A 260 NM

Méthodes.

La détermination du coefficient d'extinction a été faite par pesée du virus à poids constant. Après une sédimentation de cinquante minutes à 105.000 g, le virus est remis en suspension dans de l'eau bidistillée de façon à obtenir une suspension évaluée, d'après estimation spectrophotométrique, à 2%.

Dix à vingt mg environ de virus sont répartis dans des boîtes à tare. Ils sont séchés à l'étuve à 80° et pesés à poids constant sur une balance Mettler au dixième de mg près.

Résultats.

Le tableau VIII donne les résultats de six pesées de virus. Le coefficient d'extinction de la nucléoprotéine, c'est-à-dire la D.O. d'une suspension d'un mg de virus par ml dans une cuve de 1 cm de large est $C = 2,5 \pm 0,2$. C'est-à-dire, une D.O. de 1 correspond à $0,4 \pm 0,04$ mg de virus.

TENEUR EN ACIDE NUCLEIQUE

La nature et la teneur en acide nucléique ont été déterminées en utilisant la méthode de CERIOTTI (1955).

L'acide nucléique que contient SCMV-Ampefy est de l'acide ribonucléique (ARN), caractérisé par la coloration bleue à l'orcinoï.

Le tableau IX donne la teneur en ARN de deux échantillons de virus.

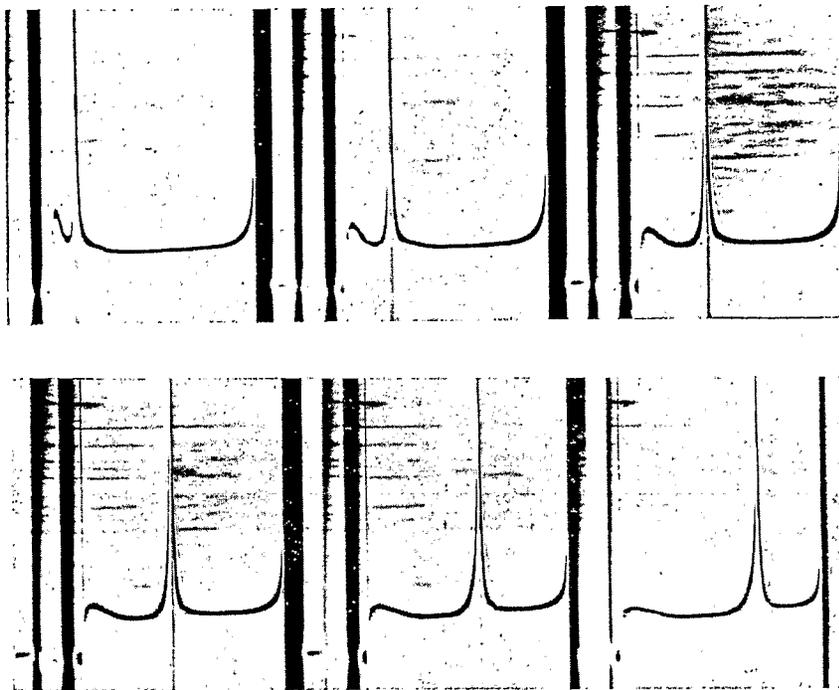


Fig. 11. — Diagramme de sédimentation analytique d'une suspension de SCMV-Ampefy, en tampon phosphate 0,01 M, pH 7,2. Photos prises toutes les quatre minutes de centrifugation à 25.980 tours/minute, température 21,4°.

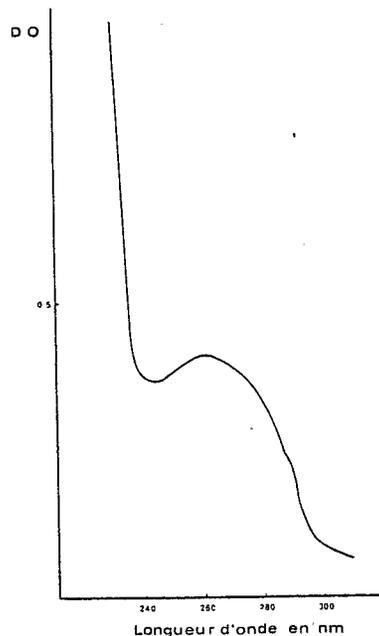


Fig. 12. — Spectre d'absorption en lumière U.V. de SCMV-Ampefy.

Tableau VIII
POIDS SEC DE SUSPENSION PURIFIEE DE VIRUS DE DO CONNUE

DO à 260 nm (dilution 1/20)	Volume utilisé (en ml)	Poids sec du virus (en mg)	Coefficient d'extinction
1,02	1	8,8	2,32
1,06	1	9,5	2,22
0,99	2,7	22,3	2,39
0,91	2,5	15,82	2,88
0,68	1,7	9,46	2,44
0,95	2	14,05	2,70

Tableau IX
TENEUR EN ACIDE NUCLEIQUE DE DEUX ECHANTILLONS DE SCMV-AMPEFY

DO à 260 nm	Concentration de virus (en mg/ml)	DO à 657 nm	Concentration de ribose (en mg/ml)	Concentration de l'ARN (en mg/ml)	% d'ARN dans le virus
0,5 × 4 = 20	0,80	0,085	0,013	0,0489	6,1
0,5 × 8 = 40	1,60	0,155	0,0235	0,0883	5,5

TENEUR EN PHOSPHORE

Les teneurs en phosphore de SCMV-Ampefy peuvent être estimées selon la technique de HORECKER, MA et HAAS (1940).

Vingt analyses de P en fonction de la densité optique de la suspension virale permettent d'établir la droite de régression entre la D.O. et la teneur en phosphore (fig. 13). Avec une corrélation de 0,95, une D.O. de 0,735 correspond à 1,59 µg/ml de phosphore, soit 2,16 µg/ml de P pour une D.O. de 1, soit encore 400 µg de virus. Ces valeurs sont analogues à celles obtenues par HILL, FORD et BENNER (1973). A raison de 10 % de P dans

l'ARN, on détermine ainsi une teneur en ARN de 5,4 % dans le virus.

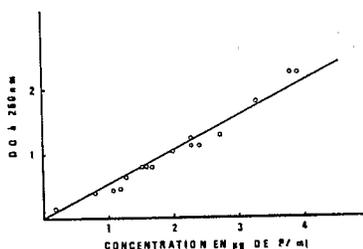


Fig. 13. — Relation entre la teneur en P par ml et la D.O. d'une suspension de SCMV-Ampefy.

TENEUR EN AZOTE

Quatorze analyses d'azote en fonction de la D.O. de la suspension virale permettent d'établir la droite de régression entre la D.O. et la teneur en azote (fig. 14). Avec une corrélation de 0,91, une D.O. de 1,81 correspond à 120,1 µg de N, soit 66,35 µg d'azote pour une D.O. de 1, qui correspond à 400 µg de virus.

Ceci correspond à une teneur de 16 % d'azote dans le virus, valeur tout à fait classique pour une nucléoprotéine.

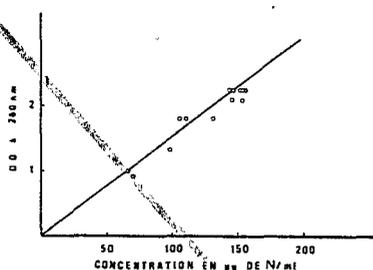


Fig. 14. — Relation entre la teneur en N et la D.O. d'une suspension de SCMV-Ampefy.

CONCLUSIONS

Les extraits purifiés de suspension virale permettent d'obtenir des préparations homogènes à l'ultracentrifugation analytique et donnent un spectre reproductible de nucléoprotéine.

Le rapport des D.O. 260 nm/280 nm de $1,20 \pm 0,02$ du spectre de SCMV-Ampefy est en accord avec les valeurs trouvées pour le MDMV par SEHGAL et JEAN (1970), JONES et TOLIN (1972) et LANGENBERG (1973), soit 1,18. Par contre, il est nettement inférieur à celui de $1,27 \pm 0,02$ signalé par GORDON et GINGERY (1973). Quelques préparations virales obtenues après exclusion de la colonne d'agarose peuvent donner un rapport des D.O. 260 nm/280 nm de 1,3, mais ce rapport baisse à $1,2 \pm 0,02$ après une ultracentrifugation complémentaire qui élimine les nucléoprotéines normales de la plante. De plus, ces préparations avec un rapport de 1,3 n'ont pas de pouvoir infectieux à une dilution supérieure à celle des autres préparations. En fin de purification, le rapport des D.O. 260 nm/280 nm de la souche SCMV-Ampefy n'a jamais dépassé 1,23.

Le coefficient d'extinction de $2,5 \pm 0,2$ pour 1 mg/ml/cm est une valeur classique de ce type de virus. Pour le Tobacco Etch Virus (TEV), qui est un bâtonnet flexueux de 750 nm de long, avec un spectre analogue à celui de SCMV-Ampefy, ce coefficient est de 2,4 pour 1 mg/ml/cm.

Les diverses analyses de la teneur en ARN, en N et en P donnent des résultats qui concordent avec ceux obtenus par pesées. Le rapport D.O. 260 nm/280 nm est identique à celui du VMT, dont la teneur en acide nucléique a été déterminée avec précision à 5%, (TAKAHASHI, 1951). La

teneur en ARN de SCMV-Ampefy est donc voisine de 5%.

Point de précipitation de SCMV-Ampefy

METHODES

L'action du pH sur SCMV-Ampefy a été étudiée par une technique voisine de celles utilisées par OSTER (1951), TREMAINE (1970) ou WURTZ (1969).

Le virus ne peut être dialysé longuement contre de l'eau distillée, car il s'agrége. Après la deuxième ultracentrifugation au cours de la purification du virus, le culot (8 à 10 mg de virus) est repris dans 5 ml d'eau distillée. Il est possible qu'il reste des traces de sels, mais elles sont certainement faibles en raison du volume

d'eau ajoutée. Des gouttes de HCl ou de NaOH 0,01 N sont ajoutées à la pipette Pasteur dans la préparation. Les pH sont lus au dixième près au pH-mètre Tacussel avec une électrode double concentrique pouvant plonger dans un tube. L'agrégeation du virus est appréciée par turbidimétrie à la longueur d'ondes de 460 nm au spectrophotomètre Jobin Yvon, Stand MV.

RESULTATS

Le virus s'agrége vers les pH acides. On observe une précipitation à l'œil au pH 5,5, puis la suspension s'épaissit. La D.O. augmente jusqu'au pH 4,5, puis diminue (fig. 15). Le point de précipitation de SCMV-Ampefy se trouve donc à un pH voisin de 4,5.

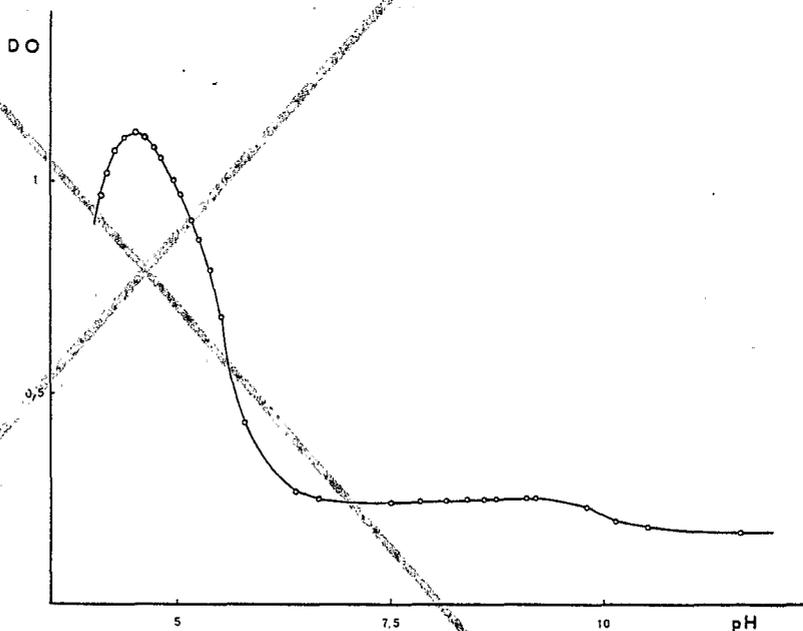


Fig. 15. — Variation de la D.O. à 460 nm d'une suspension de SCMV-Ampefy, en fonction du pH.

Vers les pH basiques, la D.O. se maintient jusqu'à pH 9, puis diminue légèrement entre les pH 9,5 et 10.

A pH 4,5, le virus peut être sédimenté en tube conique par centrifugation à basse vitesse (dix minutes à 6.000 g). Le culot est facilement remis en suspension dans du tampon borate 0,01 M pH 8,6. Le spectre de la sus-

pension obtenue est caractéristique de celui du virus. Le pouvoir infectieux est conservé. Des extraits virosés dans le tampon borate 0,01 M pH 8,6 sont encore infectieux à une dilution de 0,5 µg/ml. Cette limite de dilution est du même ordre que celle des préparations virales en suspension dans un tampon phosphate 0,05 M pH 7 (tableau X).

Tableau X

POUVOIR INFECTIEUX DE SCMV-AMPEFY, EN FONCTION DE LA DILUTION DANS DEUX TAMPONS DIFFERENTS, A pH 7,2 ET pH 8,6 (exprimé en nombre de maïs virosés par rapport au nombre de maïs inoculés)

Quantité de virus (en γ/ml)	Tampon phosphate (0,01 M pH 7,2)	Tampon borate après précipitation acide (0,01 M pH 8,6)
100	16/18	8/10
10	16/19	7/10
1	7/20	2/9
0,5	7/20	0/10
0,1	0/20	

La précipitation acide d'une suspension virale dans l'eau distillée peut permettre une étape supplémentaire de purification. Une suspension virale dont le spectre indique un rapport des D.O. 260 nm/280 nm de 1,16 est dialysée deux heures contre de l'eau distillée. Le pH est ajusté à 4,5. Le virus est alors sédimenté par une centrifugation de cinq minutes à 8.000 g en tubes coniques. Le culot est repris dans du tampon borate 0,01 M pH 8,6. Le spectre de la suspension indique un rapport des D.O. 260 nm/280 nm de 1,22, ce qui correspond aux meilleures préparations de virus obtenues. Le surnageant présente un spectre de nucléoprotéine avec un rapport des D.O. 260 nm/280 nm de 1,12. La précipitation acide peut donc être valablement utilisée dans le cas où la purification n'a pas donné une suspension virale avec un bon rapport des D.O. 260 nm/280 nm. Le rendement obtenu avec cette étape supplémentaire de précipitation acide reste satisfaisant (1 kg de feuilles a donné en fin de purification, y compris la précipitation acide, 12 mg de virus).

CONCLUSIONS

Peu d'observations ont été faites sur l'influence du pH sur les souches SCMV-A, SCMV-H et MDMV. PIRONE et ANZALONE (1966) ont purifié le SCMV-H après clarification de l'extrait virosé par acidification à pH 4,7, mais en milieu alcalin ($\text{SO}_3 \text{Na}_2$ 0,01 M), ce procédé de clarification a donné les meilleurs résultats du point de vue pouvoir infectieux pour cette souche. Par contre, cette technique n'a pas permis de purification convenable de la souche des hauts plateaux malgaches ; ceci s'explique par le fait que le pH 4,5 entraîne l'agrégation de la souche SCMV-Ampefy, qui sédimente alors à basse vitesse. La souche SCMV-Ampefy n'a probablement pas les mêmes propriétés de surface que les autres souches citées. Ces résultats confirment les points de vue précédemment exposés en ce qui concerne la nécessité de mettre au point une technique de préparation spécifique.

IV. DISSOCIATION DU VIRUS EN SES CONSTITUANTS

Propriétés de l'ARN.

METHODES

Deux techniques ont été utilisées pour obtenir de l'ARN de SCMV-Ampefy : la méthode au phénol, décrite par GIERER et SCHRAMM (1956) et la méthode au chlorhydrate de guanidine utilisée pour le virus X de la pomme de terre par REICHMANN et STACE-SMITH (1959). La technique de préparation de l'ARN de MDMV, utilisée par PRING et LANGENBERG (1973) n'a pu être utilisée pour des raisons matérielles.

La masse moléculaire de l'ARN de SCMV-Ampefy a été déterminée par comparaison de sa migration électrophorétique sur gel de polyacrylique à 2,4% avec celle de divers ARN de masses moléculaires connues, selon la technique de LOENIG (1969). Les ARN marqueurs, fournis par L. PINCK, sont les suivants :

- ARN de VMT,
- ARN, composant lourd (25 S) de l'*Atalfa Mosaic Virus*. Ces deux ARN

ont été préparés par la méthode au phénol de GIERER et SCHRAMM (1956).

— ARN ribosomal d'*Escherichia coli* (25 S et 16 S) préparés à partir de cultures d'*E. coli* par la méthode de LOENIG (1969).

RESULTATS

La technique de GIERER et SCHRAMM (1956) permet de préparer un ARN dont les propriétés sont les suivantes :

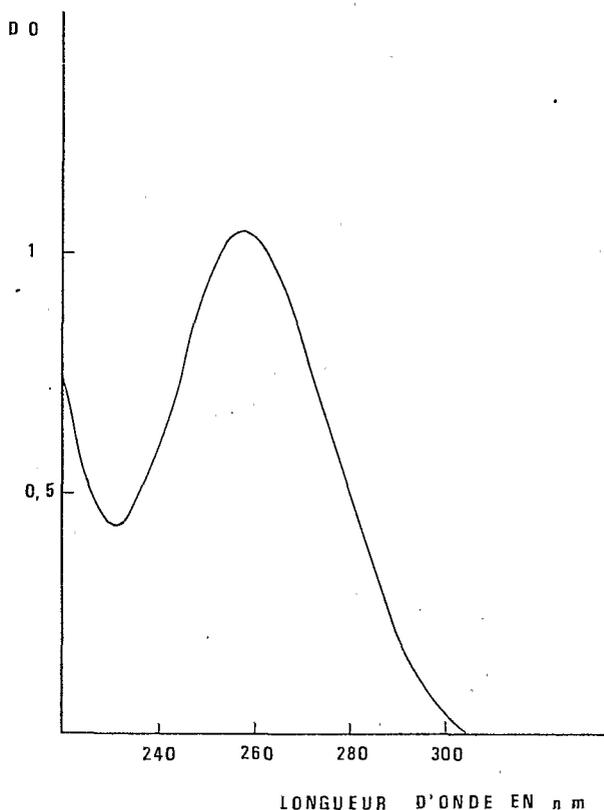


Fig. 16. — Spectre de l'ARN de SCMV-Ampefy.

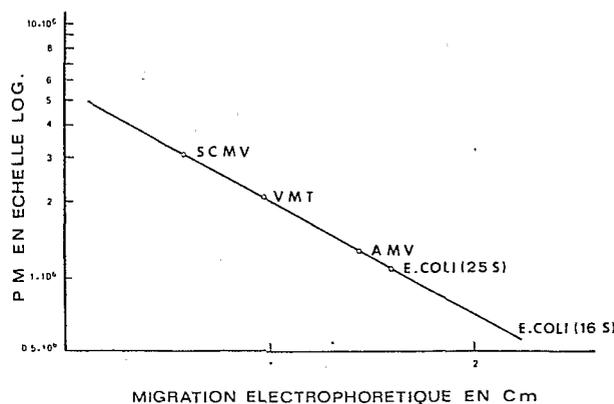


Fig. 17. — Détermination du poids moléculaire de l'ARN de SCMV-Ampefy, d'après sa migration électrophorétique, comparée à celles de l'ARN de VMT, AMV et *E. coli*.

Tableau XI

POIDS MOLECULAIRE ET MIGRATION ELECTROPHORETIQUE DE L'ARN DE SCMV-AMPEFY ET D'ARN DE REFERENCE

ARN	P. M. × 10 ⁶	Références	Migration électrophorétique (en cm)
SCMV-Ampefy	—	—	0,58
VMT	2,1	Boedker, 1960	0,96
AMV (25 S)	1,32	Pinck, 1972	1,44
E. coli (23 S)	1,08	Loenig, 1969	1,44
E. coli (16 S)	0,56	Loenig, 1969	2,1

— le spectre (fig. 16) est caractéristique d'un acide nucléique : il a un maximum d'absorption à 258 nm, un minimum à 232 nm et les rapports des D.O. 258 nm/280 nm = 2,3 et 258 nm/232 nm = 2,4,

— il n'y a pas de pouvoir pathogène après l'inoculation à des variétés de maïs Planta, à des concentrations de 100, 30 et 10 µg/ml, soit à des concentrations 100 à 1.000 fois plus élevées que les concentrations infectieuses en virus,

— l'examen de l'ARN à 40 µg/ml, en présence de tampon phosphate 0,1 M pH 7 dans l'ultracentrifugeuse analytique par absorption dans l'ultraviolet, indique que la préparation contient un composé 34 S,

— l'analyse de l'ARN sur gel de polyacrylamide (fig. 17) montre que les préparations contiennent un seul composé de poids moléculaire élevé : 3,1 × 10⁶ daltons (tableau XI).

La méthode de préparation au chlorhydrate de guanidine permet d'obtenir un acide nucléique à spectre caractéristique, mais qui n'est pas infectieux en présence de bentonite ou de malacoid, aux doses de 120, 32 et 12 µg/ml.

CONCLUSIONS

Divers essais de préparation d'ARN par la méthode au phénol n'ont pas donné d'acide nucléique infectieux (SEHGAL, 1968 ; PRING et LANGENBERG, 1972). Ces derniers auteurs pensent que cela est dû à un temps de préparation relativement important. PRING et LANGENBERG (1972) ont préparé un ARN infectieux de MDMV-B selon une méthode décrite par BRAKKE et VAN PELT (1970) pour un autre virus en bâtonnets flexueux, le *Wheat Streak Mosaic Virus*. Cette méthode n'a pu être appliquée à SCMV-Ampefy pour des raisons matérielles. Dans leur expérience, PRING et LANGENBERG ont obtenu un ARN infectieux avec un nombre de plantes infectées de 2/7 à partir de 100 µg d'ARN, de 4/9 avec 45 µg d'ARN et 2/9 avec 4 µg d'une autre préparation d'ARN. Le pouvoir infectieux de cet acide nucléique est donc faible, et nos essais de pouvoir infectieux avec les préparations au

phénol ont été réalisées avec des concentrations faibles en ARN de SCMV-Ampefy (10, 30 et 100 µg).

La masse moléculaire de 3,1 × 10⁶ daltons, obtenue avec l'ARN de SCMV-Ampefy est nettement supérieure à celle de 2 × 10⁶ daltons signalée pour le MDMV-B par PRING et LANGENBERG (1972), qui semble faible. Le coefficient de sédimentation de 34 S est, par contre, du même ordre que celui de MDMV-B (35 S). Il est donc possible que les essais de pouvoir infectieux aient été réalisés avec des doses trop faibles en ARN, ou avec des hôtes qui ne convenaient pas, et que la méthode de préparation de l'ARN au phénol ou au chlorhydrate de guanidine ne soit pas à éliminer.

Préparation de la protéine.

Diverses méthodes de préparation de la protéine ont été utilisées. La méthode à l'acide acétique, utilisée pour le VMT, ne permet pas d'obtenir de protéine non agrégée. Il en est de même pour les préparations obtenues avec NaCl 2 N. Les meilleurs résultats ont été obtenus avec l'urée et le chlorhydrate de guanidine.

METHODES

La préparation de la protéine par action du chlorhydrate de guanidine se fait de la même manière que la préparation de l'ARN.

L'action de l'urée est fonction du pH et de la force ionique. Elle a été étudiée à pH 7,2 et à pH 8,6 en tampon phosphate 0,01 M, 0,1 M et 0,566 M, ainsi qu'en tampon borate 0,02 M, 0,1 M et 0,2 M à la température du laboratoire (25°).

La dégradation du virus peut être suivie par la mesure de la diffusion de la lumière de la suspension virale à 320 nm. 3 à 5 mg de virus dans 0,5 ml de tampon sont dilués par addition de 1,5 ml d'une solution d'urée à concentration convenable pour obtenir la molarité finale désirée. Après action de l'agent de séparation, la protéine est purifiée par trois précipitations au sulfate d'ammonium à 50 %, et remise en suspension dans du tampon borate 0,2 M pH 8,6. Après

la dernière précipitation, la préparation est dialysée pour éliminer les dernières traces de sulfate d'ammonium.

RESULTATS

Le chlorhydrate de guanidine sépare l'ARN d'une protéine (fig. 18). La D.O. à 300 nm montre que cette protéine est assez fortement agrégée.

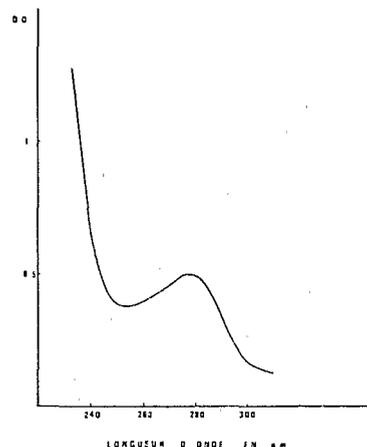


Fig. 18. — Spectre de la protéine de SCMV-Ampefy.

L'action de l'urée dans un tampon à faible molarité et à pH 8,6 est montrée par la figure 19. L'urée dégrade le virus à partir d'une molarité de 2 M. A 1,5 M et M, de nombreuses particules virales ne sont pas encore dégradées après vingt-quatre heures, tandis qu'à une concentration en urée de 2 M, le virus est entièrement dégradé au bout de deux heures, c'est-à-dire qu'à ce moment il n'est plus possible d'observer de particules virales au microscope électronique. A partir de 3 M, le virus se dégrade rapidement, l'action étant la plus rapide à une molarité de l'urée de 6 à 8 M. A pH 7,2, l'action de l'urée est plus lente. Aux faibles molarités de tampon, la protéine s'agrège, et sa remise en suspension est impossible. Avec un tampon borate 0,2 M ou de fortes molarités de tampon phosphate, la protéine est soluble. La D.O. à 300 nm montre toutefois qu'elle est agrégée.

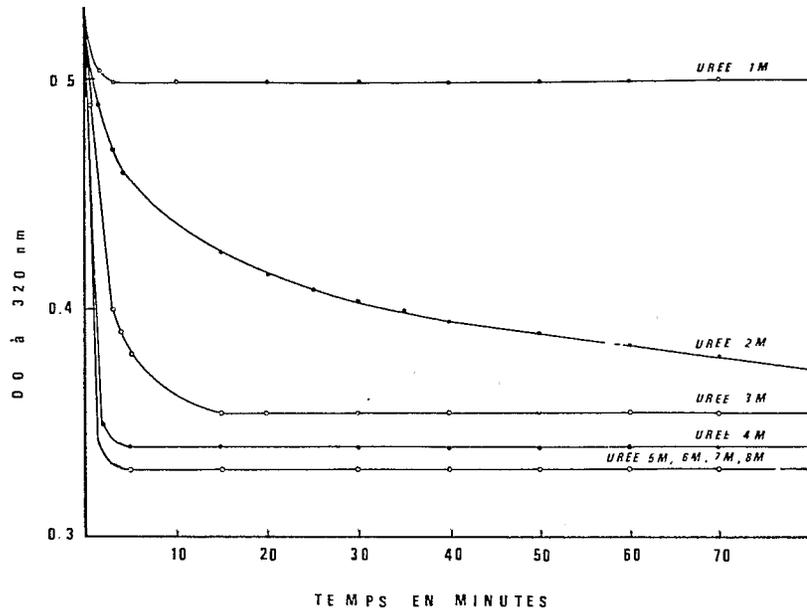


Fig. 19. — Cinétique de la dégradation de SCMV-Ampefy, en fonction de la molarité de l'urée, à pH 8,6 en tampon borate 0,01 M à une température de 25°.

Tableau XII

COORDONNEES DU POINT MOYEN ET DES PENTES DES DROITES CALCULEES
POUR LES DIFFERENTES PROTEINES ETALONS

N° de référence	Protéine étalon	Coordonnées du point moyen	Pente	Pente déterminée par BALZ	Poids moléculaire	Références
1	α Chymotrypsinogène	184,6 8,3	2,17	2,10	25.700	WEBER et OSBORN (1969)
2	Anhydrase carbonique	178,7 9,2	2,4	2,35	29.000	WEBER et OSBORN (1969)
3	Pepsine	177,3 8,1	3,23	3,35	35.000	HEDRICK et SMITH (1968)
4	Ovalbumine	167,9 8,1	4,8	4,9	47.000	WEBER et OSBORN (1969)

Détermination du poids moléculaire de la protéine.

Le poids moléculaire de la protéine de SCMV-Ampefy a été déterminé selon la méthode de HEDRICK et SMITH (1968), en présence de dodécylsulfate de sodium (VAN REGENMORTEL, HENDRY et BALTZ, 1972).

COURBES ETALONS

Trois à cinq mesures ont été réalisées par échantillon.

Les résultats obtenus avec les différentes protéines étalons sont donnés au tableau XII, et comparés aux résultats obtenus par BALTZ (1972).

Le graphe de la figure 20 montre l'ensemble des droites obtenues pour les protéines étalons et celle de SCMV-Ampefy.

Le graphe de la figure 21 donne la courbe étalon obtenue en portant en ordonnée la pente des droites des protéines étalons et en abscisse la masse moléculaire des protéines.

POIDS MOLECULAIRE DE LA PROTEINE DE SCMV-AMPEFY

Expérience préliminaire.

Une première expérience pour la recherche du poids moléculaire de la protéine de SCMV-Ampefy en gel de polyacrylamide à 10% a montré qu'une préparation virale conservée plusieurs mois à 4° présentait trois bandes différentes, correspondant aux poids moléculaires de 36.000, 31.000 et 25.000, la première bande étant beaucoup plus importante que les deux autres (fig. 22 et fig. 23).

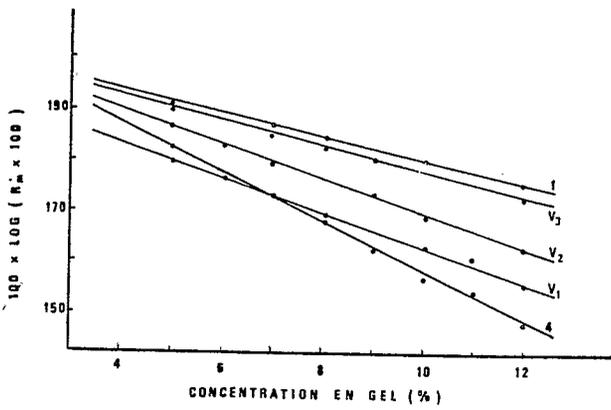


Fig. 20

Variation de la mobilité électrophorétique de différentes protéines, en fonction de la concentration en gel de polyacrylamide :

- 1 : α chymotrypsinogène ;
- 4 : ovalbumine ;
- V₁ : SCMV-Ampefy, bande 1 ;
- V₂ et V₃ : SCMV-Ampefy, bandes 2 et 3.

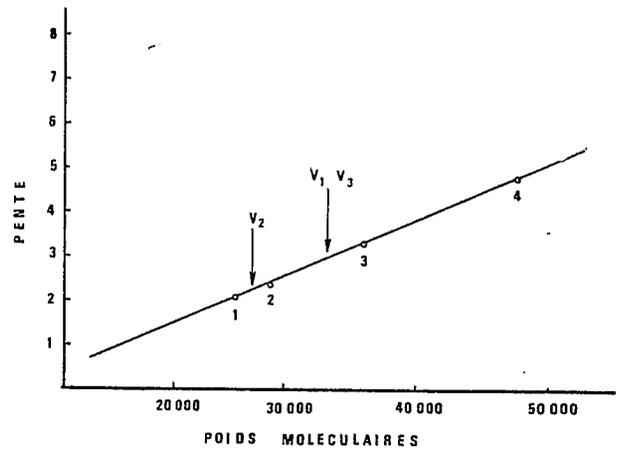


Fig. 21. — Migration électrophorétique en gel de polyacrylamide (méthode de HEDRICK et SMITH, 1968) : courbe étalon de la pente en fonction du poids moléculaire des protéines.

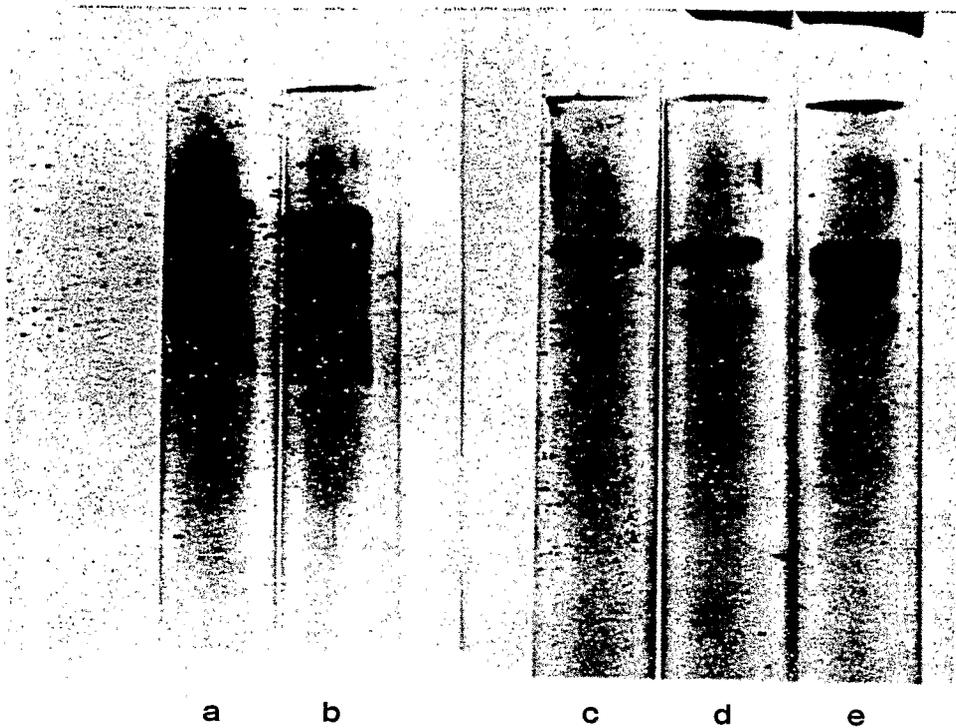


Fig. 22. — Analyse sur gel de polyacrylamide (10%) de la protéine de SCMV-Ampefy :
 a - Marqueurs : *Barley Stripe Virus*, *Virus de la Mosaïque Jaune du Navet*, VMT.
 b - SCMV-Ampefy et marqueurs.
 c - SCMV-Ampefy à 6 γ .
 d - SCMV-Ampefy à 30 γ .
 e - SCMV-Ampefy à 90 γ .

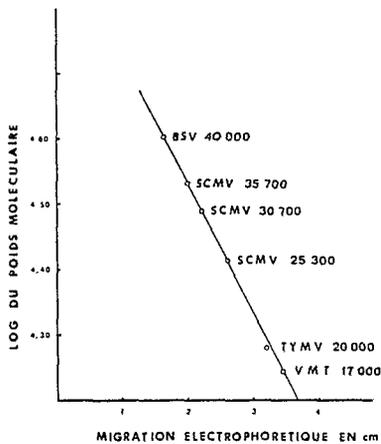


Fig. 23. — Détermination du poids moléculaire de la sous-unité protéique de SCMV-Ampefy par comparaison à des protéines de poids moléculaires connus, dans le seul gel de polyacrylamide à 10 %.

Electrophorèse de solution virale fraîchement préparée.

Le poids moléculaire de la protéine de SCMV-Ampefy a été déterminé sur plusieurs préparations de virus fraîchement obtenues, le broyage et la clarification étant réalisés le plus rapidement possible (3 heures). Ces préparations virales présentaient un spectre caractéristique, et un pouvoir infectieux élevé.

Deux bandes, parfois trois, sont observées :

— la bande supérieure (V_1), la plus importante, permet de calculer une droite de pente 3,1. Cette droite ne coupe pas les droites étalons au point 1,5. Par contre, elle coupe la droite de régression correspondant à l'ovalbumine pour une concentration en gel de 7 %. Elle correspond à une protéine de poids moléculaire de 34.000.

— la bande inférieure (V_3), beaucoup moins importante, permet de calculer une droite de régression de pente 2,3, qui passe par le point d'intersection des droites de protéines étalons. Elle correspond à une protéine de poids moléculaire de 27.000.

— une bande intermédiaire occasionnelle (V_2) peut être observée sur certaines préparations. Elle correspond à une droite de pente 3,2 qui coupe les droites étalons. Elle est parallèle à la première droite V_1 .

Un virus fraîchement préparé a été soumis à une électrophorèse de zone, selon la technique de VAN REGEN-MORTEL (1964), technique qui permet de séparer des protéines très voisines, comme deux souches virales. Le virus

purifié ainsi donne néanmoins une préparation de protéine présentant toujours en gel, les deux bandes V_1 et V_3 de pente 3,1 et 2,3.

Electrophorèse de préparations virales dégradées.

Une préparation virale a été réalisée avec un broyat de feuilles ayant attendu une nuit à 4° ; une autre préparation a été faite lentement, une journée s'écoulant entre le broyage et la fin de la clarification. Les préparations purifiées obtenues étaient fortement agrégées et ne permettaient pas d'observer le spectre caractéristique du virus. Il n'y avait aucun pouvoir infectieux.

Après électrophorèse en gel de polyacrylamide de ces préparations, on observe deux bandes, l'une très importante qui permet de calculer une droite de régression de pente 2,2, ce qui correspond à un poids moléculaire de 27.000, l'autre bande étant très fine et elle correspond à une droite de pente 3,3, ce qui correspond à une protéine de poids moléculaire de 34.000.

Electrophorèse de préparation de protéine virale.

La protéine virale a été préparée par la méthode au chlorhydrate de guanidine, décrite par REICHMANN et STACE-SMITH (1959). A partir d'une préparation virale infectieuse avec un spectre caractéristique de nucléoprotéine, on obtient une protéine fortement agrégée.

Après électrophorèse, on n'observe qu'une seule bande. La droite de régression coupe la droite de régression de l'ovalbumine pour une concentration en gel de 7 %. Elle correspond à la bande V_1 du virus, de poids moléculaire de 34.000.

De la protéine virale a été préparée après carboxyméthylation selon la méthode de HARRIS et HINDLEY (1961), afin d'éviter la formation de ponts disulfure lors de la dénaturation de la protéine. Obtenue à partir de virus infectieux non agrégé, la protéine présente deux bandes comme le virus d'origine, de poids moléculaire de 34.000 et 37.000, la première protéine étant la plus importante.

Electrophorèse de protéines normales de canne à sucre.

Un extrait de canne à sucre saine est traité comme un extrait virosé. Un très faible culot vert est repris après la deuxième ultracentrifugation (le total d'un culot représentant un extrait de 500 g de feuilles de canne à sucre), et remis en suspension dans 1 ml de tampon phosphate 0,01 M pH 7,1. Il

donne de fins agrégats qui absorbent dans l'ultra-violet sans donner de spectre en raison de la forte diffusion de la lumière.

La suspension est traitée comme une protéine pour subir une électrophorèse en gel de polyacrylamide. Une quantité maximum de 0,2 ml de protéine est déposée à la surface du gel. Cela correspond à une concentration au moins vingt fois supérieure à celle des protéines virales utilisées.

On obtient une bande qui correspond à la droite de pente 2,3, obtenue avec la préparation virale, soit un poids moléculaire de 27.000.

Les surnageants de la deuxième ultracentrifugation reconcentrés par le sulfate d'ammonium à 40 % donnent plusieurs bandes très discrètes qui ne correspondent pas aux bandes étudiées.

Action d'enzymes sur le virus purifié.

KOENIG et al. (1970) ont montré que le virus X de la pomme de terre se dégrade sous l'action d'enzymes, et l'analyse électrophorétique montrait la présence de deux sous-unités de protéine de poids moléculaires de 24.000 et 29.900.

L' α chymotrypsine Choay 25 cristallisée lyophilisée (250 CHB) et la trypsin Choay à 1.250 unités Pharmacopée française, ont été utilisées. Une préparation purifiée de virus dans le tampon phosphate 0,01 M pH 7,1 physiologique, a été incubée pendant deux et 20 heures à 29°, à raison de 1 mg de virus pour 2 unités CHB d' α chymotrypsine ou avec 40 unités Pharmacopée française de trypsin. La sous-unité protéinique est fortement dégradée sous l'action des deux enzymes au bout de deux heures. Les deux premières bandes disparaissent. La troisième bande est fortement réduite. On observe, par contre, une large zone diffuse qui correspond à des poids moléculaires de 12.000 à 17.000. Après vingt heures, on n'observe plus la troisième bande.

Action de la température sur la sous-unité protéinique.

Une suspension virale purifiée à 7 mg/ml est plongée dans un bain thermostaté à 29°. Une goutte de chloroforme permet d'éviter tout développement bactérien. Les échantillons prélevés sont immédiatement préparés pour l'électrophorèse sur gel de polyacrylamide.

Après 2 h 30 de traitement à 29°, on observe les mêmes bandes que sur le témoin conservé à 4°. La bande de poids moléculaire 27.000 paraît toujours plus importante (fig. 24).

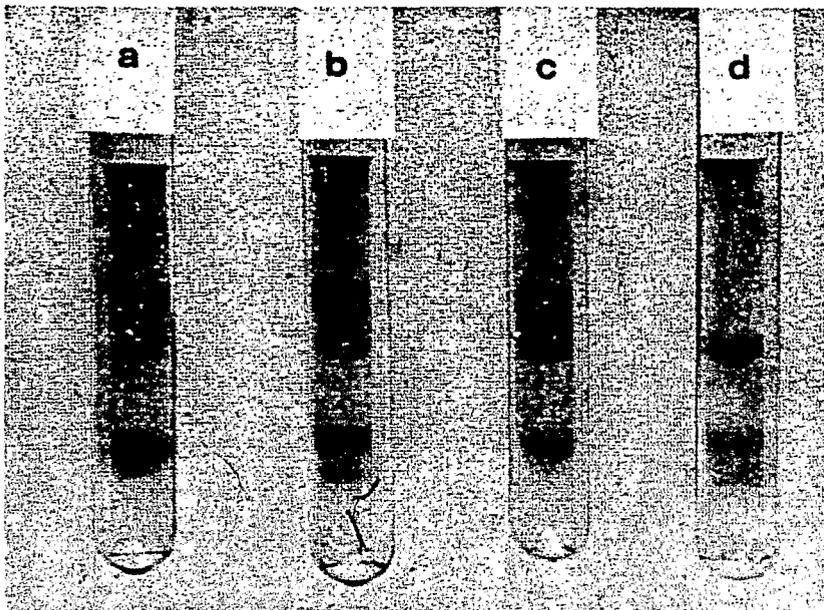


Fig. 24

Analyses en gel de polyacrylamide de SCMV-Ampefy conservé à 29°, en fonction du temps :

- a : temps 0 ;
- b : 2 heures à 29° ;
- c : 16 heures à 29° ;
- d : 48 heures à 29°.

Après vingt heures, la bande supérieure, de poids moléculaire de 34.000 paraît dédoublée, la bande intermédiaire est toujours présente, et la bande inférieure, de poids moléculaire 27.000 est fortement renforcée.

Après quarante heures, on n'observe plus qu'une seule bande très large, la bande inférieure de poids moléculaire 27.000.

Discussion.

Une préparation virale peut donner trois bandes de protéines en électrophorèse sur gel de polyacrylamide. Deux bandes sont parallèles, ce qui peut correspondre à des protéines de même poids moléculaire (34.000) mais de charge différente (HEDRICK et SMITH, 1968). Ces bandes correspon-

dent à des préparations infectieuses, qui donnent un spectre caractéristique de virus.

La troisième bande peut correspondre à des préparations virales dégradées, non infectieuses, ou à des protéines normales. Pour obtenir une bande visible avec des protéines normales, il faut utiliser une concentration au moins vingt fois plus forte en matériel végétal sain qu'à partir du matériel virosé. Par contre, le virus purifié se dégrade à 29°. Après quarante heures d'incubation, on n'observe plus que la bande de poids moléculaire de 27.000, alors qu'au temps 0 la bande de poids moléculaire 34.000 est la plus importante. Au bout de seize heures, on observe un stade intermédiaire. Par contre, une préparation virale, conservée deux ans à 4°, présente une impor-

tante bande de poids moléculaire 34.000 et une légère bande de poids moléculaire 27.000. Il semble donc bien que la bande de poids moléculaire 27.000 soit due à une dégradation de la protéine virale, fonction de la température. Cette dégradation est difficile à éviter en raison des conditions matérielles de manipulation, la centrifugeuse n'étant pas réfrigérée, et la température du laboratoire variant de 23° à 26°.

La valeur du poids moléculaire de la sous-unité protéinique de SCMV-Ampefy est donc de 34.000. Cette valeur est proche de celle de 36.500 déterminée pour le MDMV-B par électrophorèse sur gel de polyacrylamide à 10% (HILL, FORD et BENNER, 1972). Il faut noter qu'avec la seule détermination de l'électrophorèse sur un gel à 10% de polyacrylamide, on obtient la même valeur de 36.500 pour SCMV-Ampefy. Par contre, ces mêmes auteurs ont obtenu un poids moléculaire de la protéine de MDMV-B de 28.000 par analyse des acides aminés.

Composition en acides aminés.

Quatre hydrolyses de vingt-quatre, quarante-huit, soixante-douze et cent vingt heures de protéine fraîchement préparée ont été faites, et la composition en acides aminés a été déterminée à l'acide-amino analyseur de l'Institut de Botanique de Strasbourg par M^{me} PETER.

Le tryptophane étant détruit par l'hydrolyse, a été déterminé par la méthode de PORTNER et HOGL (1952). Les résultats d'analyse de tryptophane à partir de deux prélèvements de protéines obtenues par l'action de l'urée 8 M sont donnés au tableau XIII. On obtient une moyenne de 1,2% en poids de tryptophane dans la molécule. Le poids moléculaire du tryptophane étant de 204,23, la molécule de la sous-unité protéinique est donc un multiple de $204,23 \times 100$

soit 17.000. Pour un poids moléculaire de 34.000, il doit donc y avoir deux molécules de tryptophane.

Les résultats des quatre analyses de la sous-unité protéinique sont donnés au tableau XIV.

Tableau XIII
DOSAGE DU TRYPTOPHANE DANS DES SUSPENSIONS DE SCMV-AMPEFY

Tryptophane en γ /tube	D. O. à 619 nm	
	0,25	100
	0,50	210
	0,75	325
	1	430
Essai 1 (1,89 mg de virus)		110
		100
Essai 2 (3,78 mg de virus)		160
		160
		160

Tableau XIV

RESULTATS DE QUATRE ANALYSES DES ACIDES AMINES DE SCMV-AMPEFY, SELON LA DUREE DE L'HYDROLYSE
(Les résultats sont exprimés en micromoles d'acides aminés par prise de 0,3 ml de l'hydrolysate.)

Acides aminés	Durée de l'hydrolyse			
	24 heures	48 heures	72 heures	120 heures
Acide aspartique	0,252	0,251	0,236	0,253
Thréonine	0,172	0,212	0,194	0,222
Sérine	0,124	0,180	0,130	0,159
Acide glutamique	0,264	0,268	0,246	0,266
Proline	0,087	0,101	0,107	0,107
Glycine	0,319	0,328	0,312	0,345
Alanine	0,230	0,214	0,226	0,231
Valine	0,103	0,112	0,103	0,122
Méthionine	0,085	0,087	0,090	0,098
Iso-leucine	0,064	0,070	0,065	0,074
Leucine	0,118	0,120	0,120	0,131
Tyrosine	0,063	0,064	0,062	0,061
Phénylalanine	0,066	0,067	0,066	0,069
Lysine	0,129	0,126	0,126	0,130
Histidine	0,053	0,053	0,055	0,057
Arginine	0,123	0,123	0,121	0,122

La cystine et la cystéine sont présentes dans la protéine, on peut observer un pic correspondant à la cystéine. Mais leur teneur n'a pas été déterminée, une oxydation performique n'ayant pu se faire.

Au cours de l'hydrolyse, aucune te-

neur d'acide aminé ne semble baisser régulièrement. Par contre, le taux de leucine paraît augmenter avec la durée de l'hydrolyse. La valeur obtenue après cent vingt heures d'hydrolyse seule a été retenue, les variations pouvant provenir de liaisons peptidiques

particulièrement stables. Les variations des autres acides aminés ont paru suffisamment modérées et réparties au hasard sur les quatre hydrolyses pour pouvoir en prendre les moyennes (tableau XV).

Tableau XV

COMPOSITION EN ACIDES AMINES DE LA PROTEINE DE SCMV-AMPEFY
(Nombre d'acides aminés S = 273. Poids moléculaire de la protéine : 33.667.)

Acides aminés	μ moles par 0,3 ml	HIS = 6 × 11,1	Nombre de μ mol. par mol.	P. M. des acides aminés	P.M. dans la molécule
Acide aspartique	0,248	29,5	29	113,06	3.859
Thréonine	0,222	27,5	27	119,08	3.215
Sérine	0,180	20,0	20	105,06	2.101
Acide glutamique	0,261	29,0	29	147,08	4.263
Proline	0,101	11,2	11	115,08	1.265
Glycine	0,345	38,3	38	75,05	2.850
Alanine	0,225	24,9	25	89,06	2.226
Valine	0,122	13,5	13	117,09	1.521
Méthionine	0,098	10,9	11	149,15	1.641
Iso-leucine	0,068	7,5	7	131,11	918
Leucine	0,131	14,5	14	131,11	1.834
Tyrosine	0,062	6,9	7	181,09	1.288
Phénylalanine	0,067	7,4	7	165,09	1.156
Lysine	0,128	14,2	14	146,13	2.046
Histidine	0,054	6	6	155,09	931
Tryptophane			2	204	408
Arginine	0,122	13,5	13	174,1	2.264
			273		33.667

Tableau XVI

COMPOSITION EN ACIDES AMINES DE LA PROTEINE DE SCMV-AMPEFY,
COMPAREE A CELLE DE MDMV-B, ET DU VIRUS Y DE LA POMME DE TERRE

Acides aminés	SCMV-Ampéfy	MDMV-B (Hill et al.)	Virus P de la pomme de terre (Miki et Oshima)
Acide aspartique	29	27	17
Thréonine	27	25	16
Sérine	20	20	9
Acide glutamique	29	29	22
Proline	11	10	10
Glycine	38	34	10
Alanine	25	23	15
Valine	13	12	13
Méthionine	11	11	11
Iso-leucine	7	8	9
Leucine	14	13	12
Tyrosine	7	9	7
Phénylalanine	7	7	5
Lysine	14	12	10
Histidine	6	5	5
Tryptophane	2	4	2
Arginine	13	14	13
Cystéine		1	1
Total	273	264	187

L'acide aminé le moins abondant est l'histidine. Pour obtenir un poids moléculaire proche de celui déterminé par électrophorèse sur gel de polyacrylamide, il convient de considérer qu'il y a 6 molécules d'histidine dans la molécule de la sous-unité protéinique. Ceci nous conduit à multiplier toutes les valeurs par $6/0,054 = 11,1$. On obtient alors 273 résidus d'acides aminés, non comprise la cystéine, ce qui donne un poids moléculaire de 33.667 sans la cystéine.

Tous les acides aminés sont représentés. Cinq acides aminés (Asp. Thr. Glu. et Ala.) composent plus de la moitié de la molécule, la glycine étant la plus abondant (14 %).

La composition en acides aminés de la sous-unité protéinique de SCMV-Ampefy est très proche de celle déterminée pour le MDMV-B par HILL, FORD et BENNER (1973) (tableau XVI). La haute teneur en glycine (38 résidus) est du même ordre que celle de MDMV-B (34 résidus). Elle est plus du double de celle déterminée pour d'autres potyvirus comme le virus Y de la pomme de terre (MIKI et OSHIMA, 1972). Les teneurs en thréonine et sérine sont également élevées.

Avec 273 résidus d'acides aminés par molécule de la sous-unité protéinique, on peut calculer un poids moléculaire de 34.000 qui concorde avec celui déterminé par électrophorèse sur gel de polyacrylamide.

V. — STRUCTURE DU VIRUS

SCMV-Ampefy est caractérisé par les propriétés suivantes :

- longueur de la molécule : 750 nm,
- pas de l'hélice : 3,4 nm,
- pourcentage en ARN : 5 %,
- poids moléculaire de l'ARN : $3,1 \times 10^6$ daltons,
- poids moléculaire de la sous-unité protéinique : 34.000 daltons.

De ces données, on peut déduire :

— le nombre de tours d'hélice : $750/3,4 = 220$ tours,

— le poids moléculaire du virus : $3,1 \times 10^6$

$$\frac{3,1 \times 10^6}{5} = 62 \times 10^6 \text{ dont } 58,9 \times 10^6$$

pour la seule protéine,

— le nombre de sous-unités protéiques : $\frac{58,9 \times 10^6}{34.000}$ soit 1.730,

— le nombre de sous-unités protéiques par tour : $\frac{1.730}{220} = 8$.

Ces données sont proches de celles observées par VARMA et al. (1968) sur les virus filamenteux. Le SCMV-Ampefy appartient au deuxième groupe de VARMA et al., caractérisé par un pas de l'hélice de 3,4 nm. Ce groupe correspond aux flexidivirales (HIRTH, 1971). Le nombre de sous-unités protéiques par tour d'hélice paraît plus faible : 8 au lieu de 10 à 14 sous-unités, pour 3 du virus X de la pomme de terre et 12 pour deux virus du groupe du virus S de la pomme de terre.

CHAPITRE II

PROPRIETES SEROLOGIQUES DE LA SOUCHE SCMV-AMPEFY ET LEURS APPLICATIONS

Il y a une dizaine d'années, les techniques sérologiques n'étaient pas utilisées pour l'étude du SCMV, par suite des difficultés rencontrées pour obtenir des immunosérums spécifiques (ABBOTT, 1961). Pourtant, dès 1960, DIJKSTRA et GRANCINI ont montré que le *Sorghum Red Stripe Virus* était apparenté sérologiquement au SCMV. A partir de 1964, les recherches sur le MDMV et l'étude des relations de ce virus avec le SCMV ont permis de montrer que le SCMV-H avait des propriétés antigéniques facilement utilisables (SHEPHERD, 1965).

Nos recherches ont eu pour but de mettre au point une méthode de diagnostic rapide de la maladie, une technique de dosage du virus, et de comparer les résultats obtenus avec la souche SCMV-Ampefy à ceux des souches étrangères de SCMV et de MDMV.

METHODES

Les immunosérums ont été préparés par injection des préparations virales de SCMV-Ampefy partiellement purifiées, obtenues après la chromatographie d'exclusion sur gel d'agarose, afin d'avoir suffisamment de matériel pour traiter un lot plus important de lapins.

Les immunosérums préparés contre SCMV-A, SCMV-B, SCMV-D, SCMV-H, SCMV-I et MDMV-A ont été obtenus auprès du docteur GILLASPIE, Université de Floride ; les antigènes SCMV-A, SCMV-B, SCMV-D et MDMV-A ont été envoyés par le Dr GILLASPIE au Laboratoire des Virus des Plantes de Strasbourg. Ils y ont été multipliés sur la variété de maïs « Dixie 22 » et ont pu ainsi être comparés à la souche SCMV-Ampefy.

La teneur en antigène viral est déterminée selon la technique décrite par LEBEURIER et HIRTH (1966). Chaque point des courbes est la moyenne de quatre prises d'échantillons traitées séparément. Les extraits virosés sont obtenus en broyant des feuilles dans du tampon Tris-EDTA 0,05 M, pH 7,2 avec 0,1 % de mercaptoéthanol, à raison de 2 ml de tampon par gramme de feuilles (dilution 1/2) puis en clarifiant le jus de plante par addition de chloroforme, à raison de 1 volume pour 4 volumes. Les immunosérums sont également dilués au 1/2, avec une solution de NaCl physiologique.

Le latex (B.D. Mérieux 81) est sensibilisé au SCMV-Ampefy en appliquant la méthode décrite par BERCKS (1967). L'avidité du latex est étudiée en fonction de la concentration en gamma-globulines de l'immunosérum utilisé pour la sensibilisation. Pour cela, le latex est préparé en le mêlant à des quantités variées de gamma-globulines purifiées de l'immunosérum correspondant : soit à la dilution encore capable de donner de gros flocons lors de test ordinaire de précipitation en tube avec l'extrait de virus ; soit à la dilution donnant seulement des flocons moyens ; soit au double de la dilution limite pour laquelle on observe encore une floculation.

ETUDE DES IMMUNSERUMS OBTENUS

Réaction des protéines normales.

En milieu liquide, aucune précipitation n'a été observée pour une dilution de 1/4 de l'immunosérum anti-SCMV-Ampefy et de 1/2 de l'extrait de plant de canne à sucre ou de maïs sains (tableau XIX). A des dilutions inférieures, l'opacité des suspensions ne permet pas d'observer de précipité, à moins d'attendre un temps tel que les extraits de canne à sucre ou de maïs déposent d'eux-mêmes.

Tableau XVII

DIAGRAMME DE PRECIPITATION, PAR LA TECHNIQUE D'OUCHTERLONY, ENTRE UN IMMUNSERUM ANTI-SCMV-AMPEFY ET UN EXTRAIT BRUT DE PROTEINES NORMALES DE CANNE A SUCRE, DE MAIS ET DE SORGHO

Immun-sérum	Antigène : Canne à sucre NCo 310				Antigène : Maïs Planta				Antigène : Sorgho Tx 3042			
	1/2	1/4	1/8	1/16	1	1/2	1/4	1/8	1	1/2	1/4	1/8
1	++	++	++	—	++	++	++	—	+	+	+	+
1/2	++	++	—	—	++	++	++	—	++	++	+	+
1/4	+	—	—	—	+	+	—	—	+	+	+	—
1/8	+	—	—	—	—	—	—	—	+	+	—	—
1/16	—	—	—	—	+	—	—	—	+	—	—	—

++ : Ligne de précipitation après 70 heures.
 + : Ligne de précipitation après 120 heures.
 — : Pas de précipitation.

Tableau XVIII

DIAGRAMME DE PRECIPITATION, PAR LA TECHNIQUE D'OUCHTERLONY, ENTRE UN IMMUNSERUM ANTI-SCMV-AMPEFY ET DES EXTRAITS ANTIGENIQUES DE CANNE A SUCRE, DE MAIS OU DE SORGHO, CLARIFIES PAR LE CHLOROFORME (1 vol. pour 4 vol.) - Observation après 120 heures.

Immun-sérum	Antigène : Canne à sucre NCo 310				Antigène : Maïs Planta				Antigène : Sorgho Tx 3042			
	1/2	1/4	1/8	1/16	1	1/2	1/4	1/8	1	1/2	1/4	1/8
1	—	—	—	—	+	+	—	—	+	—	—	—
1/2	—	—	—	—	+	—	—	—	+	—	—	—
1/4	—	—	—	—	+	—	—	—	+	—	—	—
1/8	—	—	—	—	+	—	—	—	—	—	—	—
1/16	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—

+ : Précipitation.
 — : Pas de précipitation.

Tableau XIX

DIAGRAMME DE PRECIPITATION EN MILIEU LIQUIDE ENTRE UN IMMUNSERUM ANTI-SCMV-AMPEFY ET DES EXTRAITS DE CANNE A SUCRE SAINS ET VIROSES

Antigènes	Dilution de l'immunsérum									
	1/4	1/8	1/16	1/32	1/64	1/128	1/256	1/512	1/1024	1/2048
Canne saine :										
1/2	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
1/10	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
Canne à sucre virosée :										
1/2	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
1/10	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
1/20	+	+	+	+	+	+	+	+	—	—
1/40	+	+	+	+	+	+	+	+	—	—
1/80	+	+	+	+	—	—	—	—	—	—
1/150	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—

+ : Précipité après 3 heures à 36°.
 — : Pas de précipité après 3 heures à 36°.

Des résultats plus lisibles ont été obtenus par la technique de diffusion en gélose d'Ouchterlony. Les diagrammes de précipitation sont donnés au tableau XVII. Une ligne de précipitation peut être observée entre un immunsérum anti-SCMV-Ampefy dilué au 1/2 et au 1/4 et des extraits bruts de plantes saines de canne à sucre, de maïs ou de sorgho, dilués au 1/2, 1/4 et 1/8. Une ligne très fine peut encore être observée à une dilution de 1/8 de l'immunsérum pour les mêmes dilutions des antigènes. Avec des extraits clarifiés au chloroforme de

sorgho ou de maïs sains, l'immunsérum non dilué donne une ligne de précipitation jusqu'à une dilution au 1/4 de l'antigène. On n'observe pas de ligne de précipitation pour une dilution au 1/2 de l'immunsérum et au 1/2 de l'antigène (tableau XVIII).

Titre et avidité de l'immunsérum anti-SCMV-Ampefy.

Les molécules d'une longueur supérieure à 500 nm ne peuvent migrer dans la gélose à 1% à moins de traitements qui cassent les particules.

La technique d'OUCHTERLONY ne peut donc être appliquée à SCMV-Ampefy, sauf si l'on procède à des traitements préalables des extraits d'antigène (BOND et PIRONE, 1971). Le titre de l'immunsérum anti-SCMV-Ampefy a donc été étudié en milieu liquide. Les résultats obtenus pour un exemple d'immunsérum sont consignés au tableau XIX. Avec un extrait de plante non purifié, le titre limite d'un immunsérum est plus élevé avec des suspensions antigéniques peu diluées, de l'ordre de 1/10. Telle est la règle générale avec les virus en bâtonnets

(VMT, virus X ou virus S de la pomme de terre...) pour lesquels le diagramme de précipitation ne révèle pas nettement de phénomène de zone. Divers immunosérums ont des titres compris entre 1/500 et 1/5.000. Le sérum SV 72, de titre 1/2.048, donne un titre de 1/512 jusqu'à une dilution de l'antigène de 1/40. A la dilution de l'antigène de 1/80, le titre de l'immunosérum diminue. Entre cette dilution de 1/40 et 1/80, le pouvoir infectieux des extraits virosés n'est plus que de 50% du nombre de plants inoculés, traduisant une diminution de la teneur en virus (tableau IV).

Pour détecter la quantité la plus faible possible de virus dans les extraits de plantes non purifiés, cet immunosérum de titre 1/2.048 ne doit pas être dilué à plus de 1/32. Dans ce cas, on peut déceler la présence de virus dans des extraits non purifiés, dilués au 1/80.

L'avidité de l'immunosérum peut être déterminée contre du virus purifié. Un précipité en milieu liquide est facilement visible avec une suspension antigénique de 10 µg/ml et l'immunosérum dilué à 1/256 (tableau XX). Avec attention, on peut observer un précipité

avec 5 µg de virus à la dilution précise de 1/64 pour cet immunosérum. Le point de dilution limite du pouvoir infectieux de la suspension virale est déterminé par inoculation mécanique au maïs, pour 0,1 µg de virus (tableau XXI), c'est-à-dire une dilution supérieure à la limite de l'observation sérologique. Les extraits virosés sont infectieux à une dilution supérieure à celle détectable par la méthode de précipitation en milieu liquide.

Tableau XX

DIAGRAMME DE PRECIPITATION D'UN IMMUNSERUM ANTI-SCMV-AMPEFY CONTRE UN EXTRAIT PURIFIE DE VIRUS (dilué en tampon phosphate 0,05 M pH 7,2, physiologique).

Dilution de l'antigène (en γ/ml)	Dilution de l'immunosérum									
	1/2	1/4	1/8	1/16	1/32	1/64	1/128	1/256	1/512	1/1024
160	++++	++++	+++	+++	+++	++	++	+	-	-
70	+++	++++	+++	+++	++	++	++	++	+	-
30	+++	++++	+++	+++	+++	++	++	+	-	-
10	+	++	++	++	++	++	++	+	-	-
5	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-
2,5	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

Le nombre de + indique l'intensité de la précipitation.

Tableau XXI

TESTS D'INFECTIVITE SUR MAIS, INOCULE MECANIQUEMENT PAR FRICTION AVEC LA SUSPENSION VIRALE PURIFIEE UTILISEE POUR L'ETUDE DE L'AVIDITE DU SERUM (Tableau XX)

Dilution du virus (en γ/ml)	Nombre de plants infectés
	Nombre de plants inoculés
5	15/17
2,5	14/19
1	3/20
0,5	1/19
0,1	1/20
0,05	0/20

TECHNIQUE DE DIAGNOSTIC DE LA MALADIE

Le diagnostic de la virose est particulièrement délicat sur des cannes à sucre en fin de végétation, ce qui correspond au moment où l'on prélève des boutures pour plantation. Il est malaisé sur des plantes atteintes de carence ou de troubles physiologiques variés. Le diagnostic sérologique est particulièrement utile dans ces cas. On souhaite alors mettre en évidence les plus faibles teneurs en antigène viral. On pourrait songer pour cela à utiliser des extraits non dilués, mais de tels extraits ne permettent pas de réaliser des tests suffisamment spéci-

fiques par précipitation en tube. C'est pourquoi des méthodes de tests sensibles, tout en n'exigeant pas l'emploi d'extraits d'antigènes concentrés, ont été recherchées. BERCKS (1967) a montré que des billes de latex, d'un diamètre de 0,81 µ environ, sur lesquelles on pouvait absorber des anticorps, pouvaient s'agglutiner si l'on ajoute des antigènes en concentrations plus faibles que celles détectées par la technique de double diffusion en gélose, ou par tests de précipitation sur lames. L'avidité du latex est meilleure s'il est préparé à partir d'une suspension de γ globulines au lieu de l'immunosérum non purifié.

Le risque d'agglutination non spécifique est bien moindre à partir de γ globulines. Ce test a été utilisé pour de nombreux virus sphériques ou des virus du groupe du virus X de la pomme de terre (BERCKS et QUERFURTH, 1971). Il est déjà utilisé en pratique courante pour le diagnostic des virus du groupe du Court-Noué, au cours des travaux de sélection sanitaire de la vigne (VUITTENEZ et KUSZALA, 1972).

Un latex sensibilisé par les γ globulines d'un immunosérum anti-SCMV-Ampefy s'agglutine en présence de l'antigène homologue alors que le même latex reste en suspension dans les alvéoles témoins pendant la durée de l'expérience (fig. 25). Les résultats de diverses combinaisons sont donnés au tableau XXII.

L'avidité du latex est déterminée par la plus grande dilution d'antigène qui agglutine les billes, et est rapportée à la dilution des γ globulines qui a donné le meilleur résultat. Une suspension de γ globulines de titre 1/5.120 présente les caractéristiques suivantes : jusqu'à la dilution 1/320 de la suspension de γ globulines, le précipité antigène-anticorps est abondant ; jusqu'à 1/640, nettement moindre ; jusqu'à 1/5.120 très léger (tableau XXIII). L'avidité des latex préparés avec les dilutions 1/600 et 1/2.500 est deux fois supérieure à celle des latex préparés avec les dilutions 1/20, 1/100 et 1/300 de la suspension de γ globulines de l'immunosérum. L'aggrégation au fond des alvéoles du latex sensibilisé avec la dilution 1/600 est plus rapide que celle du latex sensibilisé avec la dilution 1/2.500. Le latex sensibilisé à SCMV-Ampefy doit donc être préparé à partir d'une dilution de γ globulines qui correspond à une précipitation antigène-anticorps moyenne, et non au double titre comme dans la méthode originale (BERCKS, 1967) (tableau XXIV).

Contrairement à la précipitation directe en tubes, la réaction au latex montre un très net phénomène de zone rendant nécessaire une gamme de dilution de l'antigène (tableau XXV). La plus petite quantité de virus décelable par la technique au latex est de 0,2 µg/ml.

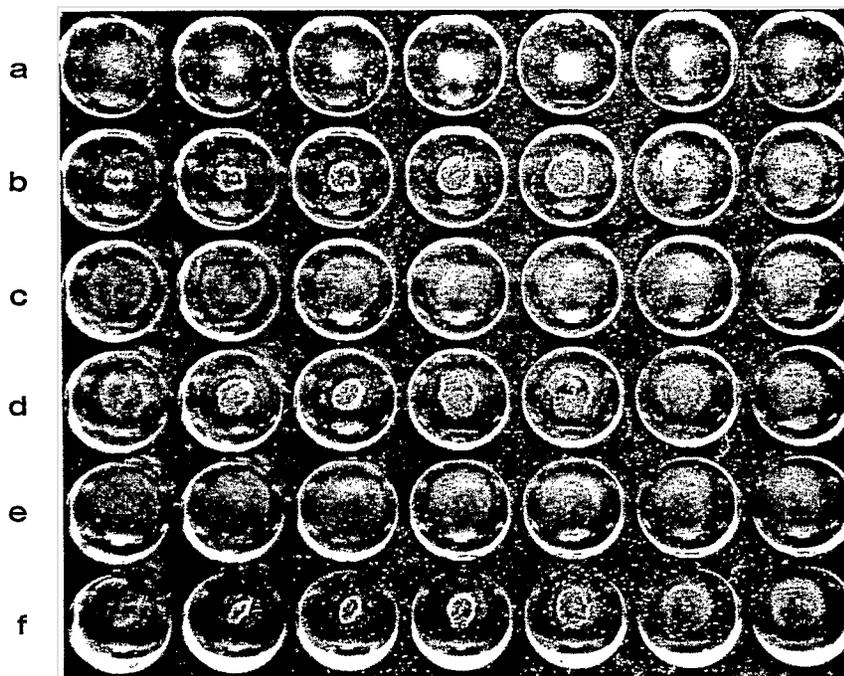


Fig. 25. — Diagnostic sérologique du virus de la mosaïque de la canne à sucre, selon la technique au latex de BERCKS :

a et e : résultats négatifs ;

b, c, d et f : résultats positifs ;

De gauche à droite, dilutions successives des extraits de feuilles dans le tampon tris-HCl 0,025 M pH 8 :

1/4, 1/8, 1/16, 1/32, 1/64, 1/128 et 1/256.

Tableau XXII

AGGLUTINATION DE LATEX SENSIBILISE PAR UN IMMUNSERUM ANTI-SCMV-AMPEFY
OU UN SERUM NORMAL DE LAPIN, EN PRESENCE DE DIVERS ANTIGENES

Antigènes	Dilution des antigènes										Latex
	1/3	1/6	1/12	1/24	1/48	1/96	1/192	1/384	1/768	1/1356	
Canne saine	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	Sérum normal.
Canne virosée	+	+	++	+++	++	+	+	+	—	—	Sérum anti-SCMV - Ampefy.
Maïs sain	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	Sérum normal.
Maïs virosé	+	+	+++	++	++	+	+	—	—	—	Sérum anti-SCMV - Ampefy.

Tableau XXIII

DIAGRAMME DE PRECIPITATION DES γ GLOBULINES D'UN IMMUNSERUM ANTI-SCMV-AMPEFY
CONTRE UN EXTRAIT VIROSE DE CANNE A SUCRE PARTIELLEMENT PURIFIE

Antigène viral	Dilution des γ globulines								
	1/20	1/40	1/80	1/160	1/320	1/640	1/1280	1/2560	1/5120
	+++	+++	+++	+++	++	++	+	+	+

+++ : Précipitation très abondante et rapide.

++ : Précipitation abondante.

+ : Précipitation lente et peu abondante.

Tableau XXIV

AVIDITES COMPAREES DE LATEX PREPARES AVEC DIVERSES DILUTIONS EN γ GLOBULINES D'UN SERUM

Dilution en γ globulines	Quantité d'antigène viral (en γ /ml)									
	28	13	6,5	3,2	1,6	0,8	0,4	0,2	0,1	0,05
1/20	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
1/100	+	+	+	—	—	—	—	—	—	—
1/300	++	+++	++	++	+	—	—	—	—	—
1/600	+++	+++	+++	+++	++	+	+	+	—	—
1/2500	++	++	++	++	++	++	+	—	—	—

+++ : Latex agrégé au fond de l'alvéole en 20 minutes.
 ++ : Latex agrégé au fond de l'alvéole en 2 heures.
 + : Agrégats de latex en suspension dans l'alvéole après 2 heures.
 — : Latex non agrégé.

Tableau XXV

RAPIDITE D'AGREGATION D'UN LATEX SENSIBILISE AVEC UN IMMUNSERUM DILUE AU 1/600, SELON LA CONCENTRATION EN ANTIGENE

Latex 1/600	Quantité d'antigène viral (en γ /ml)											
	216	108	52	26	13	6,5	3,2	1,6	0,8	0,4	0,2	0,1
	—	++	++	+++	+++	+++	+++	++	+	+	+	—

+++ : Latex agrégé au fond de l'alvéole après 20 minutes.
 ++ : Latex agrégé au fond de l'alvéole après 2 heures.
 + : Agrégats de latex en suspension dans l'alvéole après 2 heures.
 — : Latex non agrégé.

DETERMINATION SEROLOGIQUE DE SCMV-AMPEFY

L'antigène SCMV-Ampefy a été comparé aux antigènes SCMV-A, SCMV-B, SCMV-D, SCMV-E, SCMV-H et MDMV-A par la méthode de précipitation en milieu liquide ou par la méthode au latex de BERCKS. La technique de précipitation en milieu liquide consiste à chercher la dilution limite d'un immunosérum qui donne un précipité avec un antigène non dilué. Ces résultats sont donnés au tableau XXVI. Les immunosérums anti-SCMV-Ampefy agissent jusqu'à des dilutions presque équivalentes contre les antigènes SCMV-Ampefy, SCMV-A, SCMV-B et SCMV-D. L'antigène SCMV-Ampefy agit contre des dilutions des immunosérums anti-

SCMV-B et anti-SCMV-D inférieures de moitié ou du quart vis-à-vis de l'immunosérum anti-SCMV-Ampefy. L'immunosérum anti-SCMV-A ne peut être dilué qu'à 1/32, huit fois moins que l'immunosérum anti-SCMV-Ampefy, alors qu'il peut être dilué jusqu'à 1/128 contre l'antigène homologue. Par contre, l'antigène SCMV-A agit jusqu'à la même dilution des immunosérums anti-SCMV-Ampefy et anti-SCMV-A. SCMV-Ampefy agit contre l'immunosérum anti-MDMV-A très faiblement jusqu'à la dilution 1/4 de l'immunosérum. Il n'y a pas de réaction entre l'antigène SCMV-Ampefy et les immunosérums anti-SCMV-H et anti-SCMV-I.

Les résultats de la méthode au latex sont figurés au tableau XXVII. Le latex

SCMV-Ampefy porte des anticorps capables de réagir avec les souches SCMV-A, SCMV-B et SCMV-D. Les floculations observées sont aussi rapides qu'avec l'antigène SCMV-Ampefy. Les souches SCMV-Ampefy, SCMV-A, SCMV-B et SCMV-D sont proches sur le plan sérologique. Par contre, aucune floculation du latex SCMV-Ampefy n'est observée avec les antigènes SCMV-H et MDMV-A. Afin de tenir compte d'éventuelles variations d'avidité du latex selon les souches, des latex préparés avec des gamma-globulines diversément diluées ont été mélangés à l'antigène SCMV-H. Aucune floculation n'a été observée avec les latex sensibilisés avec des gamma-globulines diluées au 1/80, 1/300, 1/600 et 1/2.500.

Tableau XXVI

RELATIONS SEROLOGIQUES ENTRE LA SOUCHE SCMV-AMPEFY ET LES SOUCHES AMERICAINES DE SCMV ET DE MDMV, DETERMINEES PAR LA METHODE DE PRECIPITATION ORDINAIRE EN TUBE

Antigène	Immunsérum anti :						
	SCMV-Ampefy	SCMV-A	SCMV-B	SCMV-D	SCMV-H	SCMV-I	MDMV-A
SCMV-Ampefy	+ 1/256	+ 1/32	+ 1/160	+ 1/80	—	—	+ 1/4
SCMV-A	+ 1/128	+ 1/128					
SCMV-B	+ 1/128		+ 1/320				
SCMV-D	+ 1/256			+ 1/128			
SCMV-H	—				+ 1/1048		

Tableau XXVII

AGGLUTINATION DE LATEX SENSIBILISE PAR UN IMMUNSERUM ANTI-SCMV-AMPEFY (1/600), EN PRESENCE DE DIVERS ANTIGENES EXTRAITS DE FEUILLES DE MAIS, VARIETE DIXIE 22

Antigène	Dilution des antigènes								
	1/2	1/4	1/8	1/16	1/32	1/64	1/128	1/256	1/512
Extrait de feuilles saines ..	—	—	—	—	—	—	—	—	—
SCMV-Ampely	++	++	++	++	++	++	++	++	++
SCMV-A	++	++	+	+	+	+	+	+	—
SCMV-B	++	++	++	+	+	—	—	—	—
SCMV-D	+	+	+	+	+	—	—	—	—
SCMV-H	—	—	—	—	—	—	—	—	—
SCMV-I	—	—	—	—	—	—	—	—	—
MDMV-A	—	—	—	—	—	—	—	—	—

++ : Latex entièrement floculé au fond de l'alvéole après 2 heures.
 + : Agrégats de latex en suspension dans l'alvéole après 2 heures.
 — : Latex non agrégé.

CONCLUSIONS

Les extraits virosés avant la deuxième ultracentrifugation ne sont pas sérologiquement purs, puisque l'immunsérum donne, à concentration au moins égale à 1/8, une ligne de précipitation avec des protéines normales de canne à sucre, de sorgho ou de maïs. L'immunsérum doit donc être utilisé à une dilution supérieure à 1/10. Si l'on utilise la méthode de précipitation en milieu liquide, les immunsérums obtenus peuvent être dilués à des dilutions importantes, mais pour détecter de faibles quantités de virus, il faut les utiliser à assez forte concentration, de l'ordre de 1/30, pour un immunsérum de titre 1/2.048. Cela suppose une consommation importante d'immunsérum en cas d'une application pratique de cette technique.

Pour travailler à de fortes concentrations en anticorps, il faut clarifier les extraits virosés par le chloroforme. Ainsi, pour un immunsérum donné et pour les variétés Planta, Dixie 22 ou INRA 258 de maïs, Lousier de canne à sucre, un immunsérum dilué au 1/2 ne donne pas de ligne de précipitation avec un antigène viral dans les feuilles de maïs ou de canne à sucre.

La méthode au latex de BERCKS permet d'utiliser dans la pratique un test plus précis et plus sensible que la méthode de précipitation liquide. Alors qu'avec cette dernière on peut avoir un précipité avec 10 µg/ml, il est possible d'observer une agrégation du latex à des dilutions de 0,4 et 0,2 µg/ml, soit de vingt-cinq à cinquante fois moins. L'avidité optimum du latex est obtenue avec une grande dilution des γ globulines, diminuant le risque d'agglutination non spécifique. De plus, la méthode au latex est beau-

coup plus économique puisqu'on peut diluer l'immunsérum de trois à dix fois plus. On utilise des quantités très faibles de latex (0,05 ml) soit dix fois moins que l'immunsérum. Dans la pratique, on pourra donc faire cent fois plus d'examen avec la même quantité d'immunsérum.

Enfin, la méthode au latex permet d'obtenir des floculations spécifiques avec des suspensions d'antigènes à de faibles dilutions auxquelles les précipités en milieu liquide peuvent ne pas être spécifiques.

La souche SCMV-Ampely est fortement apparentée sérologiquement avec les souches SCMV-A, SCMV-B et SCMV-D. Aucune différence nette n'a pu être observée entre ces souches et SCMV-Ampely, tant par la technique de la dilution limite de l'immunsérum que par la méthode au latex. Par contre, aucun précipité n'est observé entre l'immunsérum anti-SCMV-Ampely et les antigènes SCMV-H, SCMV-I et MDMV-A. Ces résultats sont concordants avec ceux de SNAZELLE et al. (1971) qui distinguent sérologiquement les groupes de souches suivants :

- SCMV-A, SCMV-B et SCMV-D,
- SCMV-H,
- MDMV-A,
- MDMV-B.

D'autre part, les résultats obtenus avec l'immunsérum anti-SCMV-Ampely présentent des analogies avec ceux obtenus par TOSIC et FORD (1974) avec l'immunsérum anti-SCMV-A. Cet immunsérum anti-SCMV-A précipite contre les antigènes SCMV-A, SCMV-B et SCMV-D mais non contre MDMV-A et SCMV-I. Par contre, l'immunsérum anti-SCMV-D donne un précipité contre les antigènes MDMV-A et SCMV-I. Aucun précipité n'a été observé lors-

qu'on mélange l'immunsérum anti-SCMV-Ampely et l'antigène SCMV-H, alors que l'immunsérum anti-SCMV-A précipite avec cet antigène (TOSIC et FORD, 1974). Mais, d'après ces auteurs, une confusion paraît possible dans la détermination de SCMV-H et de SCMV-I : la souche SCMV-H que nous avons utilisée (Don de Dr GIL-LASPIE) a montré sur le sorgho Redlan les symptômes décrits par SNAZELLE et al. (1971) (cf. chap. III). TOSIC et FORD (1974) attribuent ces symptômes à SCMV-I. Il ne nous appartient pas d'intervenir dans cette discussion. Nous désignerons donc la souche sous le nom qui lui a été donné, SCMV-H, d'autant plus que l'immunsérum anti-SCMV-H a précipité avec cet antigène.

Par ailleurs, SCMV-Ampely, comme SCMV-A, est apparenté faiblement avec MDMV-A, et fortement avec SCMV-D. La souche SCMV-D est apparentée à toutes les souches de SCMV et de MDMV, en particulier à MDMV-B (TOSIC et FORD, 1974). La souche MDMV-B est liée sérologiquement à d'autres potyvirus : le *Tobacco Etch Virus* et le virus de la mosaïque du navet (MAC LAUGHLIN, HILL et BENNER, 1975). Les relations sérologiques ne sont pas en fait plus éloignées entre ces virus différents et le MDMV-B qu'entre le MDMV-B et le SCMV, ce qui confirme l'existence de liens sérologiques entre tous les potyvirus.

En conclusion, la souche SCMV-Ampely qui, comme nous l'avons déjà montré (cf. chap. I) est un potyvirus, serait liée préférentiellement à la souche SCMV-A du groupe SCMV-A, SCMV-B et SCMV-D.

A suivre

Agronomie Tropicale, N° 2, 1977)

SYNTHÈSES, NOTES ET ACTUALITÉS

ETUDE D'UNE SOUCHE DU VIRUS DE LA MOSAÏQUE DE LA CANNE À SUCRE

par Pierre BAUDIN

(suite et fin) *

RESULTATS (suite)

CHAPITRE III

SYMPTOMATOLOGIE DE SCMV-AMPEFY SUR SES PRINCIPAUX HOTES

Le SCMV et le MDMV ont été transmis par inoculation mécanique à un grand nombre de plantes appartenant à la famille des Graminées (ABBOTT, 1961; TOSIC et FORD, 1972). Les hôtes manifestent une mosaïque, sauf quelques variétés de sorgho qui peuvent donner des stries ou des nécroses brun-rouge systémiques (DEAN et COLEMAN, 1959). Avec la souche SCMV-E, une variété de sorgho, AKS 614, donne des nécroses locales sur les feuilles inoculées, suivies d'une mosaïque sur les feuilles déroulées, formées après l'inoculation (DEAN, 1970). Selon les souches de SCMV et de MDMV, les Graminées sont plus ou moins sensibles. Plusieurs plantes ont été proposées pour différencier les souches de SCMV et de MDMV. Mais l'absence de symptômes où leur netteté dépendent de l'environnement ou des conditions d'expérimentation. Ainsi, le MDMV qui n'était pas considéré comme hôte de la canne à sucre (SHEPHERD, 1965), a été inoculé mécaniquement et réisolé de quatre variétés hybrides de canne (GILLASPIE, 1967).

Les symptômes montrés par une plante à la suite de l'inoculation d'un agent infectieux sont le résultat des relations qui s'établissent entre l'hôte et le parasite. Ces relations dépendent de plusieurs facteurs qui sont essentiellement : le génome de l'hôte, celui du parasite, et l'environnement.

I. RELATIONS HOTES-PARASITES

Microbiologistes et phytopathologistes n'utilisent pas le même vocabulaire pour définir les relations d'un hôte et de ses parasites. Pour les microbiologistes (STANIER, DOUDOROFF et

ADELBERG, 1966), un micro-organisme est pathogène s'il peut produire une maladie. Mais le pouvoir pathogène peut provenir, soit de toxines produites par le micro-organisme, soit de sa multiplication intense, qui caractérise la virulence. Les phytopathologistes et les phytogénéticiens (VAN DER PLANCK, 1968), incluent deux notions dans le pouvoir pathogène : la virulence et l'agressivité, qui sont définies par rapport à la résistance des plantes aux diverses souches pathogéniques. Quand une variété est résistante à certaines races d'un agent pathogène et sensible à d'autres, sa résistance est dite verticale. Quand une variété est résistante d'une manière uniforme à toutes les races du pathogène, sa résistance est dite horizontale. La première forme de résistance est différentielle ou spécifique. Si des races de parasite présentent des interactions différentielles avec des variétés de plantes, ces races sont dites de virulence différente. Par contre, si les races de parasite ne présentent pas d'interactions différentielles sur les variétés de la plante, elles sont dites d'agressivité différente.

La résistance verticale ou différentielle (ou encore spécifique) est de nature oligogénique. Selon la théorie de FLOR (1959) ou *gene for gene system*, à chaque gène de résistance de l'hôte correspond, nombre pour nombre, un gène de virulence du parasite. La résistance horizontale est de nature polygénique. Son effet est d'ordre quantitatif et cumulatif.

La distinction entre résistance verticale et résistance horizontale n'est pas toujours aisée. VAN DER PLANCK (1968) donne de nombreux exemples pratiques parmi les maladies à champignon (Rouille du maïs, Mildiou de la pomme de terre...), parmi les bactérioses (flétrissement bactérien des Solanées) et les nématodes (*Meloidogyne* spp.). Mais, il confère à sa théorie une portée générale.

De nombreux cas de résistance oligogénique et polygénique de plantes aux virus ont été répertoriés par HOLMES (1965). La résistance oligogénique peut se traduire par l'immunité ou par l'hypersensibilité. Le cas le plus classique de résistance par hypersensibilité a été signalé par HOLMES (1964) : le tabac *Nicotiana glutinosa* répond à l'infection du VMT par des nécroses locales à une température maximale de 26°. L'étude de la descendance d'hybrides de *N. glutinosa* montre que ces nécroses locales apparaissent sur des plantes qui possèdent le gène dominant « N » (combinaisons « NN » et « Nn »), alors que la combinaison homozygote « nn », infectée par le même virus, manifeste une mosaïque. C'est une forme de résistance verticale, spécifique de la souche sauvage du VMT. Elle dépend des conditions de milieu : selon la température, les tabacs hypersensibles auxquels le virus est inoculé manifestent des nécroses locales en dessous de 30° (SAMUEL, 1931; MARTIN et GALLET, 1966).

HOLMES (1958), a déjà suggéré qu'on utilise la résistance oligogénique d'un hôte à un virus ou à une souche virale pour déterminer ce dernier. Dans ce but, le gène responsable de la résistance de l'hôte ne sera pas supposé conférer la résistance à un autre virus. Cette détermination par résistance oligogénique est différente des tests de résistance virale, largement utilisés, qui ne font pas de distinction entre la résistance oligogénique et les formes de résistance polygénique (HITCHBORN et THOMSON, 1960).

L'immunité est également une forme de résistance verticale si l'on connaît le gène qui confère cette immunité. Sinon, on ne peut pas savoir si l'on a affaire à une forte résistance horizontale, à une résistance verticale, ou à une esquivé.

* Voir début de l'article : *Agronomie tropicale*, XXXII, n° 1-1977, pp. 66-96.

22 DEC. 1978

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

Collection de Référence

n° 95 13 P 2 A

Une détermination génétique, de caractère oligogénique, des symptômes du MDMV sur le sorgho est connue. TEAKLE et al. (1970), ont inoculé une souche australienne de MDMV à une collection de variétés de sorgho manifestant une infection systématique, soit sous l'aspect d'une mosaïque (caractère « mosaïque »), soit de taches brun-rouge suivies de nécrose des feuilles et des plants (caractère « nécrose systémique ») à des températures variant entre 20° et 35°. Ils ont montré que le caractère « nécrose systémique » se transmettait dans la

descendance par hybridation inter-variétale, qu'il était monofactoriel et dominant. Les « nécroses systémiques » correspondent donc, d'après TEAKLE et al. (1970), aux combinaisons « NN » ou « Nn », et le caractère « mosaïque » aux allèles récessifs « nn ».

d'agressivité telles que les définit VAN DER PLANCK (1968). De plus, très peu de renseignements sont donnés sur l'influence de l'environnement, qui peut jouer à la fois sur la virulence et l'agressivité.

Les souches SCMV-A, B, D et E d'une part, H et I d'autre part, et MDMV-A et B n'ont pas été séparées d'après les mêmes critères. Sur canne à sucre, les souches SCMV-A, B, D et E sont identifiées sur les mêmes hôtes d'après les symptômes (SUMMERS, BRANDES et RANDS, 1948).

II. SPECIFICITE DES SOUCHES DE SCMV ET DE MDMV

Les souches de SCMV et de MDMV ont été décrites sur des critères autres que les notions de virulence et

Tableau XXVIII

INOCULATION A DOUZE CLONES DE SACCHARUM SPONTANEUM ET L'HYBRIDE KASSOER DES SOUCHES SCMV-H ET SCMV-I d'après les résultats d'ABBOTT et TIPPETT (1968)

Variétés de <i>Saccharum spontaneum</i>	SOUCHE H			SOUCHE I		
	plants inoculés	% plants mosaïqués	Limite de %	plants inoculés	% plants mosaïqués	Limite de %
Kassoer	17	94	78-100	15	94	78-100
Burma	18	78	51-91	14	57	27-79
SES 317	14	64	38-88	11	82	44-97
Tainan	14	36	16-68	15	53	27-79
US. 61. 33. 3	20	30	12-54	17	0	0-22
Coimbatore	19	26	12-54	21	86	83-100
US. 61. 1. 1	15	20	3-38	17	47	21-73
SH 249	10	10	0-45	11	55	12-62
SH 196	12	8	0-45	15	13	2-40
US. 56. 1. 4	13	8	0-45	11	9	0-45

Tableau XXIX

SENSIBILITE DE DIFFERENTS HOTES AUX SOUCHES DE SCMV, MDMV ET SORGHUM RED STRIPE VIRUS

	SCMV A, B, D, E	SCMV H, I	SCMV FS	MDMV-A	MDMV-B	Sorghum Red Stripe
<i>Saccharum officinarum</i> « Otaïiti »	+ (1)	+ (1)	+ (5)	- (7)	- (7)	
<i>Saccharum barberi</i>	+ (1)		- (5)			
<i>Saccharum robustum</i>	+ (1)	+ (1)	+ (5)			
<i>Saccharum sinense</i>	- (1)	+ (1)	+ (5)	+ (4)		
<i>Saccharum spontaneum</i> « Coimbatore »	- (1)	+ (1)	- (5)			
Sorgho d'Alep	- (8)	- (8)		+ (8)	- (8)	
Arundo donax						+ (6)
Sorgho « Tx 412 »	+ (8)	+ (8)		+ (8)	+ (8)	

- D'après : 1 : ABBOTT, 1961 ; 2 : ABBOTT, 1964 ; 3 : GILLASPIE, 1967 ; 4 : GILLASPIE, 1974 ; 5 : LIU et LI, 1953 ; 6 : LOVISOLO, 1957 ; 7 : SHEPHERD, 1965 ; 8 : SNAZELLE, 1971.

+ : plante sensible montrant une mosaïque.
- : pas de symptômes, plante immune ou très résistante.

Elles sont toutes virulentes sur ces hôtes, mais montrent des variations dans l'agressivité, ce qui n'exclut pas des variations de virulence qui n'auraient pas été mises en évidence. Par contre, la sélection de variétés résistantes éliminant systématiquement toute canne manifestant un symptôme de mosaïque, amène à la résistance de type vertical. En 1961, une nouvelle souche virale a été observée, car elle

était virulente sur CP 44-101, canne jusque-là résistante à la mosaïque (ABBOTT, 1961). Cette souche se trouve être virulente sur 32 clones de *Saccharum spontaneum* résistants aux souches SCMV-A, B, D et E, ainsi que sur Kassoer, hybride très utilisé en sélection (*S. officinarum*, Black Cheribon X *S. spontaneum*). Cette souche a été appelée SCMV-H. Une nouvelle souche, SCMV-I, est plus agressive que

la souche H sur les mêmes variétés de canne à sucre (TIPPETT et ABBOTT, 1968), ce qui n'exclut pas une variation de virulence ; si l'on classe les variétés selon leur degré d'attaque (méthode de VAN DER PLANCK, 1968), on ne trouve pas le même ordre de classement pour les deux souches (tableau XXVIII). Outre le phénomène de résistance horizontale, il doit intervenir un phénomène de résistance verticale.

Mais aucune des variétés de canne à sucre utilisées ne peut être différentielle au sens de VAN DER PLANCK (1968), tant que l'on ne connaît pas la nature de la résistance.

D'après les résultats de LIU et LI (1953), les souches de Taïwan peuvent être différenciées selon les deux critères : FS par la virulence sur l'hôte *Saccharum sinense* et les cannes hybrides résultant de croisements avec *S. sinense*, SS et YS par l'agressivité, ce qui n'exclut pas non plus la possibilité de les séparer en fonction de

leur virulence. Les souches SS et YS sont proches de la souche SCMV-A (ABBOTT et STOKES, 1966).

Des observations décrites dans la bibliographie sur les géniteurs de canne à sucre et sur les hôtes sauvages permettent de dresser un tableau général de sensibilité aux différentes souches de SCMV; de MDMV et du *Sorghum Red Stripe Virus* (tableau XXIX).

Le SCMV et le MDMV ont un point commun : la sensibilité de la variété de sorgho Tx 412 à toutes les souches

qui lui ont été inoculées. Il n'est pas possible de savoir si la résistance des autres hôtes est de type vertical ou horizontal.

La plupart des souches de SCMV et de MDMV ont été inoculées à une collection de variétés de sorgho par SNAZELLE et al. (1971). Ces variétés manifestent ou non des symptômes de mosaïque lorsqu'elles sont inoculées par les différentes souches de SCMV et de MDMV (tableau XXX). La souche SCMV-H entraîne la mort de certaines variétés.

Tableau XXX

REACTIONS DE DIVERSES VARIETES DE SORGHO A L'INOCLATION
PAR LES SOUCHES AMERICAINES DE SCMV ET DE MDMV
d'après SNAZELLE et al. (1971)

	SCMV					MDMV	
	A	B	D	E	H	A	B
Redfan	0/14	2/12	0/11	0/15	14/14 (L)	12/12	0/14
Caprock	9/14	9/10	8/11	15/16	9/9 (L)	7/10	0/14
Tx 414	0/13	0/14	0/14	7/15	16/16	14/14	0/14
Martin	0/16	0/15	0/15	1/13	17/17 (L)	14/14	0/18
New Mexico 31	0/15	14/14	3/15	9/15	14/15 (L)	9/12	0/16
Tx 412	15/15	14/14	14/14	10/13	16/16	14/14	15/15
Combine Kafir 60 (BTx 3197)	0/12	5/15	3/15	3/12	13/13 (L)	16/16	0/14
Sumac	0/14	14/14	16/16	15/15	15/15	14/14	0/13
Redbine Selection	0/15	10/14	9/14	4/13	14/14 (L)	0/12	10/13

(L) : les plants meurent au bout d'un certain temps.

III. SYMPTOMATOLOGIE DE SCMV-AMPEFY

La souche SCMV-Ampefy a été inoculée à une gamme d'hôtes choisis, soit pour leur importance agronomique à Madagascar, soit parce qu'ils donnent des symptômes caractéristiques avec les diverses souches de SCMV et de MDMV, comme les variétés de sorgho utilisées par SNAZELLE et al. (1971) et dont les semences nous ont été fournies par le Dr TOLER, Texas A & M University, USA.

Les inoculations ont été faites avec un extrait brut de plantes, dilué généralement au 1/10, dans du tampon phosphate 0,05 M pH 7,2, sauf indications contraires. Les observations ont été réalisées, soit à Tananarive, en serre à température ambiante variant entre 12° et 35°, soit à la Station de Physiopathologie Végétale de l'INRA à Dijon, en serre, dans des conditions de température analogues à celles de Tananarive, ou en salles à température contrôlée.

Canne à sucre, *Saccharum officinarum*, variété Otahiti-Louisier.

Les premiers symptômes s'observent sur la première feuille qui se déroule après l'inoculation (fig. 35) vers la base du limbe, zone de croissance des feuilles de Monocotylédones. Ils apparaissent au bout de un à deux mois, selon la saison, après l'inoculation et se caractérisent par une mosaïque de petites taches allongées, de forme irrégulière, vert sombre sur fond clair (fig. 26). Les limbes des feuilles qui se déroulent ultérieurement apparaissent entièrement mosaïqués.

Sur les feuilles d'une canne à sucre inoculée depuis plusieurs mois, les symptômes sont d'autant plus nets que les feuilles sont plus jeunes, c'est-à-dire plus proches du fuseau central. A partir de la dixième feuille, les symptômes ne sont plus caractéristiques, pouvant être confondus avec des piqûres de *Thrips*, minuscules insectes, très abondants en période fraîche et humide, ou avec des carences en azote. Puis les feuilles sont envahies

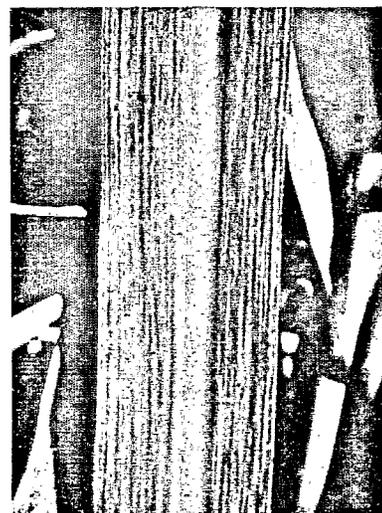


Figure 26.

Symptômes de SCMV-Ampefy sur une jeune feuille de canne à sucre, variété Otahiti-Louisier.

de parasites cryptogamiques secondaires qui en précipitent la sénescence, tels que *Leptosphaeria sacchari* et *Phyllosticta sacchari*, avant qu'elles se détachent naturellement.

Si l'on coupe longitudinalement les tiges, on observe des poches de gomme irrégulièrement réparties (fig. 27).

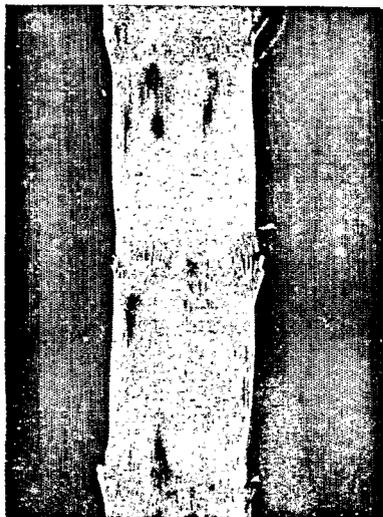


Figure 27.

Poches de gomme dans une tige de canne à sucre, variété Otahiti-Louisier, infectée par SCMV-Ampefy.

Des extraits de tige de canne à sucre ne donnent pas de précipité sérologique, ou des précipités très modérés. La teneur en virus y est donc très faible ou nulle. Cela peut expliquer le fait que les différents yeux de la tige de canne à sucre ne transmettent pas tous la maladie lors de la multiplication végétative de la plante (SUMMERS, BRANDES et RANDS, 1948). Les poches de gomme observées dans les tiges ne sont pas caractéristiques de la maladie. On en observe avec d'autres affections graves de la canne à sucre, d'origine parasitaire ou physiologique.

Après la coupe annuelle des tiges, les feuilles des repousses sont intensément chlorosées, avec des macules vertes sur fond jaunâtre. Toutefois, certaines repousses présentent des feuilles vertes et donnent des tiges d'aspect sain. Après deux ou trois repousses, les symptômes sur les feuilles nouvellement formées de certaines souches tendent à s'estomper. Les limbes présentent alors des plages allongées, étroites, de moins en moins nombreuses, puis des feuilles d'aspect sain apparaissent. Au fur et à mesure du renouvellement des feuilles, les symptômes disparaissent. Les extraits de ces feuilles ne donnent plus de précipité sérologique. Les souches de canne à sucre sont alors devenues

indemnes de virus, mais elles peuvent être réinfectées. Ce phénomène est bien connu en grande culture (ABBOTT, 1961).

Maïs, variétés Dixie 22, INRA 258, ou population Planta.

Après l'inoculation de jeunes plants âgés de trois semaines, les symptômes apparaissent à la base de la pre-



Figure 28.

Symptômes de SCMV-Ampefy sur jeunes feuilles de maïs, variété Dixie 22.

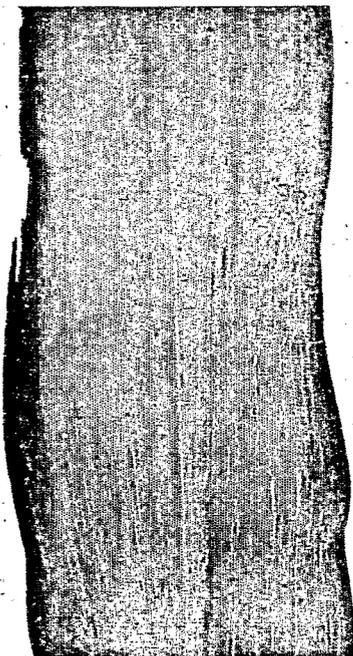


Figure 29.

Symptômes de SCMV-Ampefy sur feuilles âgées de maïs, variété Dixie 22.

mière nouvelle feuille, au bout de cinq à quinze jours selon la saison. Les symptômes foliaires ressemblent beaucoup à ceux observés sur la canne à sucre (fig. 28). Des plants plus âgés peuvent manifester des symptômes tant qu'ils forment de nouvelles feuilles. Ces symptômes peuvent encore être observés sur les feuilles après formation de la panicule terminale. Maïs, en vieillissant, les feuilles montrent des taches vert sombre et vert clair qui ne sont pas caractéristiques de SCMV-Ampefy, mais peuvent être également dues à une autre virose, le *streak* (fig. 29). Les plants virosés atteignent la même hauteur que les plants sains. Il n'y a pas de nanisme.

Sorgho.

Trois types de symptômes ont été observés selon la variété :

— une mosaïque analogue à celle observée sur le maïs ou la canne à sucre se développe sur les feuilles des variétés Tx 412 et TM 11 (fig. 30 et 31).



Figure 30.

Premiers symptômes observés sur la plus jeune feuille de sorgho, variété Tx 412, après inoculation par SCMV-Ampefy.

Cette mosaïque apparaît de cinq à huit jours après l'inoculation, sur les feuilles nouvellement déroulées. Les talles formées après l'apparition des symptômes manifestent également une mosaïque très nette. Avec la variété

de sorgho Tx 414, 3 plants sur 300 ont montré, sur la première feuille en train de se dérouler après l'inoculation, une légère mosaïque limitée à la base des feuilles. Au bout de huit jours, ces symptômes ont disparu. Toutes les autres plantes ne montrent aucun symptôme. De même pour la variété Sumac, 4 plantes sur 400 ont montré sur la première feuille déroulée après l'inoculation quelques stries chlorotiques très fines qui ont disparu après une dizaine de jours. Un extrait des feuilles présentant les symptômes permet de transmettre le virus à du sorgho Tx 412, mais non à du sorgho Sumac. Des extraits de feuilles qui ne présentent pas de symptômes, ou ayant perdu toute trace de symptôme, n'ont pas de pouvoir infectieux sur du sorgho Sumac comme sur du sorgho Tx 412. Les variétés Sumac et Tx 414 sont résistantes à l'infection. S'il y a, mais très rarement, un début de multiplication virale, on observe des symptômes de type « mosaïque ».



Figure 31.

Symptômes de SCMV-Ampefy sur feuilles de sorgho, variété Tx 412.

— des nécroses systémiques sur les variétés Caprock et AKS 614. Les premiers symptômes se manifestent de huit à quinze jours après l'inoculation sur les feuilles inoculées et sur les jeunes feuilles qui se déroulent après l'inoculation. A Tananarive, ces symptômes se produisent lorsque la température est comprise entre 15° et 30°. Les feuilles inoculées présentent des stries brun-rouge, les feuilles nouvelles une ou plusieurs bandes étroites, souvent comprises entre deux nervures, légèrement chlorosées. Ces bandes deviennent rapidement de couleur brun-

rouge, puis se dessèchent en donnant une succession de taches grises entourées d'une marge brun-rouge, ou de longues stries brunes à marge rouge (fig. 32). Au bout de trois semaines à un mois, le fuseau des jeunes feuilles se nécrose entièrement, le plant se dessèche des feuilles les plus jeunes vers les feuilles les plus âgées, puis il meurt.



Figure 32.

Symptômes en stries brun-rouge sur feuilles de sorgho, variété Caprock, infectés par SCMV-Ampefy.

— sur la variété Redlan, les feuilles inoculées avec un extrait virosé dilué au 1/10 dans un tampon phosphate 0,005 M, pH 7, présentent un aspect brûlé au bout de quelques jours. Avec des extraits dilués dans le même tampon au 1/20 ou 1/40, on peut observer

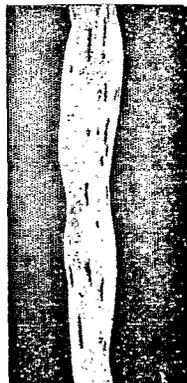


Figure 33.

Nécroses locales sur les feuilles de sorgho, variété Redlan, inoculées par SCMV-Ampefy.

des taches brun-rouge irrégulièrement réparties (fig. 33). Les feuilles apparues après l'inoculation ne sont pas protégées contre une nouvelle infection, mais le nombre de nécroses paraît plus faible. Si l'on inocule des feuilles avec des dilutions d'une même suspension virale, allant de 1/20 à 1/80, on observe une diminution du nombre des taches. Mais les chiffres obtenus sont très variables pour un même traitement ; ceci gêne leur interprétation dans une optique de dosage.

Autres graminées.

La souche SCMV-Ampefy a été transmise au blé, variété Florence Aurore, et à l'herbe du Guatemala, *Tripsacum laxum*, un des fourrages les plus répandus dans toute l'île. Ces plantes ont manifesté les mêmes symptômes que la canne à sucre.

Par contre, les espèces suivantes n'ont pas donné de symptômes après l'inoculation : *Arundo donax*, *Bracharia mutica*, *Eleusine indica*, *Pennisetum purpureum*, riz (variétés BG 79, Bluebonnet 50, Makalioka 1322, Rojofotsy 1285) et *Sorghum halepense*. Par rétro-inoculation, aucun symptôme n'a été observé.

Dicotylédones.

Aucune des Dicotylédones suivantes n'a manifesté de symptômes après l'inoculation : *Chenopodium amaranticolor*, *C. ambrosioides*, *C. murale*, *C. quinoa*, *Datura stramonium*, *Nicotiana tabacum* variété Misionero, *N. glutinosa*, *Petunia hybrida*, *Vigna sinensis*.

IV. INFLUENCE DE LA TEMPERATURE SUR LES SYMPTOMES MONTRES PAR DIFFERENTES VARIETES DE SORGHO

Dans les conditions naturelles de température observées à Tananarive (variations de 15° à 32°), le sorgho manifeste trois types de symptômes décrits précédemment :

— la variété Tx 412 donne une mosaïque ;

— les variétés AKS 614 et Caprock manifestent des nécroses systémiques ;

— la variété Redlan montre des taches rouges sur les feuilles inoculées.

Par ailleurs, certaines variétés de sorgho, qui montrent une mosaïque due au MDMV, manifestent des nécroses généralisées suivies de la mort des plants à la suite d'un refroidissement nocturne (TOLER, 1968). Il est donc intéressant d'observer les symptômes dus à SCMV-Ampefy sur les variétés de sorgho précédemment citées, à température contrôlée.

Conditions expérimentales.

Les expériences ont été conduites dans les salles climatisées de la Station de Physiopathologie Végétale de l'INRA-Dijon, aux températures de 15°, 20°, 25° et 30°, avec un éclairage journalier de douze heures à 75.000 ergs/cm²s⁻¹.

Pour chaque variété étudiée, des lots de 20 plants de sorgho sont répartis dans chacune des salles à température contrôlée. La moitié d'entre eux sont inoculés par une suspension virale à 0,3 mg/ml dans le tampon phosphate 0,005 M, pH 7,2. Huit et quinze jours après l'inoculation, deux lots, l'un de plants sains, l'autre de plants inoculés, sont transférés dans chacune des salles à température autre que la température d'origine. Les symptômes des sorghos maintenus dans la salle d'origine sont

comparés à ceux des sorghos transférés dans les nouvelles salles, à ceux des plants provenant d'une autre salle, ainsi qu'aux pots témoins sains, transférés ou non à d'autres températures.

Résultats.

SORGHO Tx 412

Le temps d'apparition des symptômes est fonction de la température. La totalité des jeunes plants inoculés présentent une mosaïque au bout de trois jours à 30°, douze jours à 25° et vingt-sept jours à 20°. A 15°, il n'y a pas de symptômes après deux mois, et les plants ne se développent pas.

A 30°, les symptômes tendent à disparaître après une quinzaine de jours. Si l'on transfère les plants quinze jours après l'inoculation de 30° à 20°, les symptômes réapparaissent sur les

jeunes feuilles. A 20°, les symptômes sont plus nets qu'à 25° et à 30°, et ils paraissent de plus en plus nets sur les talles. Les plants transférés de 30°, 25° et 20° à 15° conservent les mêmes symptômes.

Les symptômes sont donc plus ou moins nets selon la température, mais ils sont analogues. La variation d'intensité pourrait être liée à l'influence de la température sur le cycle viral. Cette étude sera abordée dans le chapitre suivant.

SORGHOS CAPROCK ET AKS 614

Le temps d'apparition des symptômes est également fonction de la température : deux jours à 30°, dix jours à 25°. Aucun symptôme n'apparaît ni à 20°, ni à 15° pendant toute la durée de l'expérience.

Tableau XXXI

NECROSES ET MORT DES PLANTS DE SORGHO, VARIETE CAPROCK, INOCULES PAR SCMV-AMPEFY D'APRES LA DUREE D'EXPOSITION DES PLANTES A DIVERSES TEMPERATURES APRES TRANSFERT A 20°

Température d'origine	Temps d'apparition des symptômes de mosaïque après inoculation	Durée d'exposition à la température d'origine		Mort des plants
		après inoculation	après apparition des symptômes	
30°	2 jours	7 jours	5 jours	Moins de 1 jour
30°	2 jours	15 jours	13 jours	3 jours
25°	10 jours	15 jours	5 jours	Moins de 1 jour

A 30°, les deux variétés montrent une mosaïque semblable à celle observée sur le sorgho Tx 412, ou sur le maïs. Après huit jours, les symptômes ont tendance à disparaître comme sur Tx 412.

A 25°, la variété Caprock manifeste également une mosaïque, la variété AKS 614 donne une mosaïque avec quelques taches brun-rouge.

Si l'on transfère les plants de ces deux variétés atteintes de mosaïque des salles à 25° et à 30° dans les salles à 20° et à 15°, les tissus mosaïqués se couvrent de taches brun-rouge, puis se nécrosent. Les plants meurent plus ou moins rapidement selon les conditions de transfert (tableau XXXI). Si l'on transfère des plants qui se trouvent dans des salles à 25° et 30°, cinq jours après l'apparition des symptômes, dans des salles à 20°, ce qui revient à leur faire subir un brusque refroidissement, les plants meurent en moins de vingt-quatre heures, les feuilles déroulées et mosaïquées étant entièrement nécrosées, le fuseau central de couleur encore verte, mais desséché.

Si l'on prend des plants qui sont dans une salle à 30°, douze jours après l'apparition des symptômes, et qu'on



Figure 34.

Symptômes de SCMV-Ampéfy sur sorgho, variété Caprock, après transfert thermique. Les plus jeunes feuilles sont desséchées, la troisième feuille est encore turgescence.

les met dans une salle à 20°, les plants meurent en trois jours : le fuseau central des feuilles se nécrose en premier, les feuilles plus âgées étant encore turgescences (fig. 34).

Les plants placés dans des salles à 15° et 20°, qui sont ensuite amenés dans la salle à 30°, ne manifestent pas de symptôme jusqu'en fin d'expérience (deux mois), et ne donnent pas de précipité sérologique. Le virus ne se multiplie pas dans les plants à 15° et 20°, alors qu'il y a multiplication virale dans le maïs, variété INRA 258, à ces températures.

SORGHO REDLAN

A 25° et à 30°, les feuilles inoculées se nécrosent et se dessèchent en moins de quarante-huit heures, les autres feuilles ne montrent aucun symptôme pendant toute la durée de l'expérience. Si on inocule, avec une suspension virale à 0,03 mg/ml, soit le 1/10 de la concentration précédente, les feuilles montrent des taches allongées brun-rouge, irrégulièrement réparties sur le limbe. Les autres feuilles ne montrent aucun symptôme pendant toute la durée de l'expérience. Les feuilles des plants témoins, inoculés

avec le tampon phosphate 0,05 M, pH 7,2, ne présentent pas de symptômes.

A 15° et à 20°, quelques feuilles inoculées ou non avec la même suspension, montrent de très petites taches rouges analogues à celles observées sur des feuilles témoins, inoculées ou non avec le tampon phosphate 0,05 M, pH 7,2.

Quels que soient les transferts de température effectués, aucun autre symptôme n'est observé. Le sorgho Redlan se comporte comme un hôte à nécroses locales à 25° et à 30°. Les feuilles peuvent présenter de petites ponctuations rouges à 15° et à 20°, sans rapport avec l'infection.

Discussion.

A des températures comprises entre 20° et 30°, on peut distinguer trois types de réponse à l'inoculation par SCMV-Ampefy :

— les sorghos qui montrent une mosaïque, quelle que soit la température, comme la variété Tx 412 ;

— les sorghos à nécroses locales. Certaines variétés, comme Redlan, ne montrent que des nécroses locales, aux températures de 25° et de 30° ;

— les sorghos à infection généralisée, dans lesquels la virose ne se développe qu'à une température supérieure ou égale à 25°, comme Caprock, AKS 614. Si l'on transfère des sorghos déjà virésés à une température égale ou inférieure à 20°, on observe des nécroses brun-rouge, puis le dessèchement de la plante entière. La mort du plant est d'autant plus rapide que le temps de maintien à 25° ou à 30° est plus court. Ces observations sont analogues à celles du comportement de tabacs hypersensibles infectés par le VMT lors de transfert de température. Si l'on inocule du VMT sur *Nicotiana glutinosa* à 30°, on observe une mosaïque, alors qu'à 20°, on obtient des nécroses locales (SAMUEL, 1931). Si l'on transfère ce même tabac atteint de mosaïque de 30° à 20°, les cellules dans lesquelles la multiplication virale est en cours se nécrosent. L'importance des nécroses est également fonction du temps d'exposition à 30° (MARTIN et GALLET, 1966).

Il semble donc que l'on puisse interpréter les phénomènes observés de la façon suivante : certaines variétés de sorgho (Tx 412) qui ne se nécrosent pas, permettent la multiplication virale de 20° à 30°. Dans d'autres variétés de sorgho, dont les feuilles lésées se nécrosent à des températures relativement basses (20°), le virus ne se multiplie qu'à des températures élevées (25° à 30°). Parmi ces variétés, on observe des hôtes à infection généralisée (Caprock, AKS 614) et des hôtes

à nécroses locales (Redlan, NM 31, Redbine Selection).

Le virus se multiplie dans les variétés de sorgho Caprock et AKS 614 dès que la température atteint 25°. Par retour à température inférieure, les tissus se nécrosent. On observe alors la superposition des symptômes de mosaïque et de nécroses brun-rouge. Ce syndrome est analogue à celui observé sur la variété Caprock à Tananarive, la température y oscillant entre 15° et 32° dans une même journée. On peut expliquer l'apparition des nécroses brun-rouge sur les feuilles atteintes de mosaïque lors de la baisse de température nocturne, classiquement observée au champ (TOLER, 1968 ; SIGNORET, 1970). Cette alternance de température, fréquente dans le Sud de l'Europe et en Afrique du Sud, peut expliquer les symptômes décrits sous le nom de *Sorghum Red Stripe Mosaic Virus* (DIJKSTRA et GRANCINI, 1960), qui atteint certaines variétés de sorgho dans ces régions.

V. COMPARAISON DU POUVOIR PATHOGENE DE SCMV-AMPEFY ET DES AUTRES SOUCHES DE SCMV ET DE MDMV

Inoculation de diverses souches de SCMV à un sorgho à nécroses locales.

La variété Redlan inoculée par SCMV-H et MDMV-A manifeste une mosaïque ou des nécroses systémiques, selon la température (TOLER, 1968 ; TEAKLE et al., 1970). Cette variété donne des nécroses locales avec SCMV-Ampefy à 25° et à 30°. Afin d'éliminer l'influence des facteurs

de l'environnement sur la manifestation des symptômes, la variété Redlan a été inoculée par SCMV-Ampefy, SCMV-B et SCMV-H (dons du Dr GILLASPIE) dans les mêmes conditions expérimentales.

On peut observer les résultats suivants :

— les feuilles inoculées par SCMV-Ampefy montrent des nécroses locales ;

— les feuilles qui se développent après l'inoculation de SCMV-B et de SCMV-H montrent une mosaïque avec quelques taches brun-rouge.

La variété Redlan est un hôte à nécroses locales de SCMV-Ampefy, alors que les autres souches, SCMV-B et SCMV-H, provoquent une infection généralisée dans les mêmes conditions d'environnement.

Comparaison des symptômes des variétés de sorgho inoculées par SCMV-Ampefy avec les résultats déjà décrits à partir d'autres souches.

Le tableau de détermination des souches de SCMV et de MDMV établi par SNAZELLE (1971) (tableau XXX) est basé sur des variétés qui donnent deux types de symptômes après inoculation de MDMV-A d'après TOLER (1968) (tableau XXXII) :

— variétés de sorgho qui montrent une mosaïque quelle que soit la température : Tx 412, Tx 414, Sumac. D'après TEAKLE (1970), le génome de ces variétés est du type « nn » ;

— variétés de sorgho qui manifestent une mosaïque et qui se nécrosent s'il y a une baisse de température (TOLER, 1968). D'après TEAKLE (1970), le génome de ces variétés est du type « Nn » ou « NN ».

Tableau XXXII

SYMPTOMES MANIFESTES PAR DIVERSES VARIETES DE SORGHO, APRES INOCULATION PAR SCMV-AMPEFY OU PAR LE MDMV (selon TOLER, 1968)

Variétés de sorgho	Symptômes dus à SCMV-Ampefy	Symptômes dus à MDMV selon Toler (1968)	Génome d'après Teakle et al (1970)
Redlan	Nécroses locales sur les feuilles inoculées	Mosaïque ou nécroses systémiques, selon la température	NN
NM 31	Nécroses locales sur les feuilles inoculées	Mosaïque ou nécroses systémiques, selon la température	ou
Combine Kafir 60	Nécroses locales sur les feuilles inoculées	Mosaïque ou nécroses systémiques, selon la température	Nn
Redbine Selection	Nécroses locales sur les feuilles inoculées	Mosaïque ou nécroses systémiques, selon la température	
Tx 412	Mosaïque	Mosaïque quelque soit la température	nn
Tx 414	Traces de Mosaïque qui disparaissent	Mosaïque quelque soit la température	
Sumac	Traces de Mosaïque qui disparaissent	Mosaïque quelque soit la température	

Si l'on inocule SCMV-Ampefy à des variétés de sorgho qui ne manifestent qu'une mosaïque après l'inoculation de MDMV-A (tableau XXXII), on observe, soit une mosaïque sur l'ensemble des plants inoculés (Tx 412), soit une mosaïque sur quelques-uns des plants inoculés (Tx 414), soit quelques stries chlorotiques sur les plus jeunes feuilles (Sumac), soit aucun symptôme. Si l'on prépare un extrait de plants à partir de feuilles de la variété présentant quelques stries chlorotiques, on obtient la transmission de la virose avec un extrait à une concentration supérieure à 1/20. A partir de feuilles sans symptômes, on n'obtient pas de transmission. Après passages successifs de plants Sumac à des plants Sumac, on n'obtient plus de symptômes et aucun pouvoir infectieux n'est mis en évidence. Le virus ne peut donc se multiplier de façon continue dans cette variété. Des variétés de sorgho de même comportement vis-à-vis de MDMV (Tx 412, Sumac), n'ont donc pas les mêmes réactions vis-à-vis de SCMV-Ampefy, l'une montrant une infection généralisée, l'autre une perte rapide d'infection. S'il y a des symptômes, on observe une mosaïque, mais pas de nécroses.

Si l'on inocule SCMV-Ampefy à des variétés de sorgho qui se nécrosent quand elles sont atteintes d'une infection généralisée par le MDMV s'il y a une baisse de température, on peut également observer des nécroses selon deux types de réaction :

— certaines variétés ne se nécrosent que si le virus a pu se multiplier : Caprock, AKS 614. Le comportement paraît analogue à celui décrit pour des infections par le MDMV ;

— d'autres variétés (Redlan, NM 31), présentent des nécroses locales sur les seules feuilles inoculées par SCMV-Ampefy, alors que toutes les feuilles peuvent se nécroser par suite de l'infection généralisée de MDMV.

Discussion.

Quelques variétés de sorgho (Redlan, NM 31, Redbine Selection), donnent des nécroses locales avec SCMV-Ampefy, alors qu'elles manifestent une infection généralisée après inoculation par de nombreuses souches de SCMV et le MDMV-A. Ces hôtes à nécroses locales répondent à l'infection par une réaction précise et observable, alors que l'absence de symptômes et de rétro-infection peut aussi bien être due à une esquive, à des conditions d'environnement défavorables à l'infection qu'à la résistance verticale ou horizontale de la plante. Les hôtes à nécroses locales peuvent permettre de caractériser la souche Ampefy par rapport aux souches qui donnent des infections généralisées, bien qu'ils ne

puissent encore être considérés comme des hôtes différentiels au sens de VAN DER PLANCK (1968), tant que le déterminisme génétique de la réponse de ces sorghos à l'infection n'est pas connu.

La manifestation des symptômes de l'hypersensibilité du tabac, *Nicotiana glutinosa*, à l'infection par la souche commune du VMT est le résultat de deux phénomènes différents : la localisation virale et la nécrose (LOEWENSTEIN, 1972). Ces deux phénomènes paraissent bien séparés dans les variétés nécrotiques du sorgho infectées par SCMV-Ampefy : certaines variétés donnent une infection généralisée, avec

apparition de nécroses par transfert de température, d'autres présentent des nécroses locales qui peuvent traduire la localisation du virus.

VI. CARACTERISATION DE LA SOUCHE SCMV-AMPEFY

La souche SCMV-Ampefy peut être caractérisée par les symptômes montrés après inoculation par les variétés de sorgho suivantes :

— le sorgho Tx 412 manifeste une infection généralisée, comme après l'inoculation de toutes les autres souches connues de SCMV et de MDMV-A (tableau XXXII).

Tableau XXXIII

DIFFERENCIATION DES SOUCHES DE SCMV ET DE MDMV-A, HOTES DU SORGHO Tx 412, SUR DES HOTES HYPERSENSIBLES
Les réactions des souches autres que SCMV-Ampefy sont décrites par SNAZELLE et al. (1971)

Sorgho	SCMV							MDMV-A
	Ampefy	A	B	D	E	H	I	
Tx 412	+	+	+	+	+	+	+	+
NM 31	— (NL)	—	+	+	+	+	+	+
Redlan	— (NL)	—	+	—	—	+	+	+

— le sorgho Redlan donne des nécroses locales avec SCMV-Ampefy, mais manifeste une infection généralisée avec SCMV-B, SCMV-H et MDMV-A (tableau XXXIII) ;

— le sorgho NM 31 donne des nécroses locales avec SCMV-Ampefy, alors que SNAZELLE et al. (1971) décrivent une infection généralisée à la suite de l'inoculation des souches SCMV-D et SCMV-E, comme avec les souches SCMV-B et MDMV-A.

Les hôtes de SCMV-Ampefy sont *Saccharum officinarum* (variété Otahiti-Lousier), de très nombreuses variétés de maïs, de blé (variété Florence Aurore), l'herbe du Guatemala (*Tripsacum laxum*) qui, tous, montrent une infection généralisée.

Parmi les souches déjà décrites de SCMV, la souche SCMV-A est la plus proche de SCMV-Ampefy (tableau XXXIII). Toutefois, la souche SCMV-A infecte la variété de riz BG 79 (ANZALONE et LAMEY, 1968), qui ne montre aucun symptôme lorsqu'elle est inoculée par SCMV-Ampefy. La rétro-inoculation ne permet pas de mettre en évidence de pouvoir infectieux. Il n'est pas encore possible de conclure sur l'absence d'infectivité de SCMV-Ampefy sur cette variété de riz, car elle peut être due à de nombreuses causes.

CHAPITRE IV

INFLUENCE DE LA TEMPERATURE SUR SCMV-AMPEFY

L'importance du rôle de la température sur la multiplication des virus est bien connue par de nombreux travaux. En particulier, la multiplication du VMT a été systématiquement étudiée à diverses températures (LEBEURRIER, 1966 ; HIRTH et LEBEURRIER, 1966). A une température déterminée, la multiplication du VMT est une fonction exponentielle du temps. Trois zones de températures peuvent être distinguées :

— une zone de température optimale, entre 20° et 32° ;

— une zone infra-optimale, en dessous de 20° ;

— une zone supra-optimale, au-dessus de 32°.

Une souche thermophile VMT_{TC} a pu être isolée. Elle se développe à 36°, mais non à 28°.

Des résultats analogues ont été obtenus récemment avec le virus de la mosaïque de la luzerne (FRANCK et HIRTH, 1972). La souche sauvage se multiplie à 22°, une souche thermophile à 34°.

Le temps d'apparition des symptômes de MDMV sur maïs, leur importance, la teneur en virus déterminée par la dilution maximum d'extraits de plantes infectées, sont fonction de la température. Quand la température augmente de 15,5° à 26,5°, les symptômes se manifestent plus rapidement et plus nettement. A une température déterminée, le pouvoir infectieux d'extraits de plantes virosées passe par un maximum, puis diminue. Ce maximum est d'autant plus rapidement atteint que la température est plus élevée.

Le virus de la mosaïque de la canne à sucre est un virus de cultures tropicales. Il est intéressant de déterminer les températures favorables ou défavorables à sa multiplication dans une plante.

I. TEMPERATURE D'INACTIVATION DE SCMV-AMPEFY IN VITRO

Les potyvirus sont sensibles à des températures relativement basses, de 50° à 60° (HARRISON et al., 1971). Les différentes souches de SCMV sont inactivées en dix minutes à des températures de 50° à 55° (ABBOTT, 1953). Toutefois, aux Indes, une souche de SCMV n'est inactivée en dix minutes qu'à une température de 65° (CHONA, 1944).

Méthodes.

La température d'inactivation du virus, ou TIP (*Thermal Inactivation Point*), est déterminée selon une technique classique (SOMMEREYNS, 1967) à partir d'un extrait de feuilles non purifié. Des tubes contenant l'extrait sont plongés dans des bains thermostatés à diverses températures pendant dix minutes. Après refroidissement rapide au réfrigérateur, les extraits sont inoculés à des plants de maïs.

L'action de la température à 29° a été étudiée sur du virus purifié. Un tube contenant du virus purifié dans du tampon phosphate 0,01 M, pH 7,2, à 4 mg/ml, est plongé dans un bain thermostaté à 29°. Une goutte de chloroforme évite l'infection par des bactéries. Au bout de deux heures, seize heures et quarante-huit heures, on prélève une certaine quantité de virus dont on fait une gamme de dilutions dans le même tampon phosphate pour des inoculations. Le pouvoir infectieux est évalué, selon la méthode de BRAKKE (1970).

Résultats.

Les résultats de l'inoculation d'extraits traités à diverses températures sont donnés au tableau XXXIV. A partir de 56°, les extraits traités ne sont plus infectieux.

Conclusions.

La température d'inactivation de la souche SCMV-Ampefy est de 56°, ce qui concorde avec celles des autres souches de SCMV déjà décrites (SMITH, 1957), et celle des potyvirus. Malgré les résultats de ABBOTT (1953), les températures d'inactivation des souches de SCMV et de MDMV paraissent trop proches en fonction des souches, et trop variables en fonction des conditions d'expérimentation, pour permettre la détermination des diverses souches de SCMV et de MDMV par leur température d'inactivation (TOSIC et FORD, 1974). Toutefois, si la souche SCMV-A est inactivée à 55°-56° comme la souche SCMV-Ampefy, les autres souches de SCMV et de MDMV sont inactivées à des températures légèrement supérieures, comprises entre 56° et 58° (TOSIC et FORD, 1974).

Une préparation virale purifiée se conserve plus ou moins bien selon la température. A 29°, SCMV-Ampefy perd son pouvoir infectieux en quarante-huit heures comme les autres souches de SCMV et de MDMV. Par contre, à 4°-5°, le pouvoir infectieux se conserve pendant plus de deux ans, contrairement à ce qui a été observé pour le MDMV (SEHGAL, 1968).

II. ACTION DE LA TEMPERATURE SUR LE TEMPS D'APPARITION DES SYMPTOMES DE SCMV-AMPEFY

Les sélectionneurs de variétés résistantes de canne à sucre ont, depuis longtemps, observé de grandes variations dans le temps qui s'écoule entre l'inoculation du virus et l'apparition des symptômes. Ces derniers peuvent apparaître de sept à trente jours, parfois plus, après l'inoculation (ABBOTT, 1961). Ces variations peuvent dépendre de facteurs divers : résistance de l'hôte, agressivité de la souche virale, facteurs de l'environnement et, en particulier, la température.

L'action de la température sous conditions contrôlées a été étudiée sur maïs, la canne à sucre posant de par sa taille des problèmes matériels.

Méthodes.

L'influence de la température sur le temps d'apparition des symptômes a été étudiée sur des plants de maïs, variété Dixie 22, inoculés par SCMV-Ampefy. 300 plants de maïs, âgés de huit jours, provenant tous d'une chambre à 25°, ont été inoculés avec une suspension virale purifiée dans du tampon phosphate 0,05 M, pH 7,2, à raison de 0,3 mg/ml. Immédiatement après l'inoculation, ils ont été répartis dans des chambres à température constante respectivement de 32°, 30°, 25°, 20°, 16°-17° et 15°.

Tableau XXXIV

INOCULATION D'EXTRAITS VIROSES

dilués au 1/2, et traités pendant 10 mn à diverses températures

Température 10 minutes	Nombre de plants virosés		Limite de confiance d'un pourcentage
	Nombre de plants inoculés		
Non chauffé	27/27		88-100
45°	9/12		52-96
47°	9/12		52-96
49°	9/12		52-96
51°	7/12		32-84
53°	5/23		9-49
55°	1/11		0-45
57°	0/12		0-25
59°	0/12		0-25

A 4°, le virus purifié, en suspension dans du tampon borate 0,05 M, pH 8,6, ou du tampon phosphate 0,01 M, pH 7,2 est toujours infectieux après deux ans de conservation. Le virus, conservé en tampon borate, présente un DEP de 1/20 au lieu de 1/2.500 pour une suspension virale fraîchement préparée.

Le pouvoir infectieux des extraits prélevés dans une suspension virale conservée à 29° est donné au tableau XXXV. Il diminue rapidement ; il est déjà réduit de moitié au bout de deux heures, au 1/10 après seize heures, et

il est nul au bout de quarante-huit heures.

Tableau XXXV

PERTE DE POUVOIR INFECTIEUX DU SCMV-AMPEFY EN FONCTION DU TEMPS A 29°

exprimée en point de dilution limite

Durée	DEP
0 h	1/2.560
2 h	1/ 640
16 h	1/ 20
48 h	Pouvoir infectieux nul

avec un éclairage de douze heures par jour de 18.000 lux. 20 plants témoins sains ont été conservés par salle. Les observations sur les symptômes ont été notées de jour en jour, et ont duré au moins deux mois. Pour une température donnée, les symptô-

mes apparaissent plus ou moins lentement selon les plants. Les résultats sont exprimés d'après le temps nécessaire à l'apparition des symptômes sur la moitié des plants inoculés (indice de BEST, 1936), sur l'ensemble des plants inoculés.

Résultats.

Le nombre de plants atteints de mosaïque après inoculation par SCMV-Ampefy en fonction du temps et de la température est donné au tableau XXXVI.

Tableau XXXVI

TEMPS D'APPARITION DES SYMPTOMES SUR LA FEUILLE NEOFORMEE DE MAIS, VARIETE DIXIE 22, EN FONCTION DE LA TEMPERATURE
Les plantes sont inoculées après saupoudrage par du carborundum (400 mesh)

Température	Nombre de jours après l'inoculation										Indice 50 % en jours
	2	3	4	5	6	7	8	10	12	14	
32°	26 52	52 52	—	—	—	—	—	—	—	—	2
30°	0 59	31 59	57 59	58 59	59 59	—	—	—	—	—	3
25°	—	0 70	47 70	—	66 70	70 70	—	—	—	—	4
20°	—	—	—	0 72	5 72	33 72	43 72	59 72	69 72	69 72	8
16°-17°	—	—	—	—	0 44	18 44	33 44	39 44	39 44	39 44	8
15°	—	—	—	—	—	—	—	0 42	9 42	37 42	14

- Le numérateur est le nombre de plants malades.
- Le dénominateur est le nombre de plants inoculés.
- Indice 50 % (d'après Best) : temps nécessaire à l'apparition des symptômes sur la moitié des plants inoculés.

A 32°, tous les plants manifestent des symptômes en trois jours. L'indice de BEST est de deux jours. Les symptômes sont nets durant les premiers jours qui suivent leur apparition, puis, rapidement, ils s'estompent. Au bout de huit jours, il ne reste plus que des symptômes légers sur les deux plus jeunes feuilles de quelques plants. Si l'on transfère les plants de 32° à 20°, quinze jours après l'apparition des symptômes, ces derniers réapparaissent plus nettement.

A 30°, tous les plants manifestent une mosaïque le quatrième jour, l'indice de BEST étant de trois jours. La durée de la période d'apparition des symptômes est de vingt-quatre heures, comme à 32°. Les symptômes disparaissent également au bout de huit jours.

A 25°, tous les plants manifestent une mosaïque après le septième jour, l'indice de BEST étant de quatre jours. Les symptômes sont nets pendant les vingt premiers jours, mais ensuite ils deviennent également difficiles à observer, sauf sur les 2 ou 3 plus jeunes feuilles qui se développent après l'inoculation.

A 20°, 96 % des plants inoculés ont montré des symptômes au bout de

douze jours, l'indice de BEST étant de huit jours. Les symptômes sont très nets jusqu'en fin de culture sur toutes les feuilles.

A 16°-17°, 89 % des plantes montrent des symptômes de mosaïque au bout de dix jours, l'indice de BEST étant de huit jours. Les symptômes sont, là aussi, très nets sur toutes les feuilles jusqu'en fin de culture.

A 15°, 88 % des plants montrent des symptômes au bout de quinze jours, l'indice de BEST étant de quatorze

jours. Comme à 20° et à 16°-17°, les symptômes sont très nets jusqu'en fin de culture.

Le temps d'apparition des symptômes diminue alors que la température augmente, de quatorze jours à 15° à deux jours à 32°. A 30° et 32°, d'un plant à l'autre, on observe un écart maximum de vingt-quatre heures dans l'apparition des symptômes. De 15° à 25°, l'écart est plus long, et peut atteindre cinq jours.

Tableau XXXVII

POURCENTAGE DE PLANTS INOCULES PAR LE SCMV-AMPEFY QUI MANIFESTENT UNE MOSAÏQUE

Température	Nombre de plants malades		Pourcentage
	Nombre de plants inoculés		
25°	70/70		100 a
20°	69/72		95,8 ab
16°-17°	39/44		88,6 b
15°	37/42		88,0

Les pourcentages suivis de la même lettre ne sont pas significativement différents (P = 0,05). Les pourcentages de plants inoculés à 15° et 16-17° sont significativement différents du pourcentage à 25°

En dessous de 25°, certains plants ne montrent pas de symptômes (tableau XXXVII). Des extraits de ces plants ne donnent pas de précipité sérologique avec un immunsérum anti-SCMV-Ampefy. Par transfert de ces plants à des températures plus élevées, aucun symptôme ne se développe. L'inoculation d'extrait de ces plants à d'autres plants n'entraîne pas l'infection. Il n'y a donc pas eu de multiplication virale.

Les symptômes sont d'autant plus nets que la température est plus basse. Au-dessus de 25°, ils s'estompent après une quinzaine de jours. On n'observe plus de mosaïque que sur les plus jeunes feuilles.

III. ACTION DE LA TEMPERATURE SUR LA MULTIPLICATION VIRALE DANS UNE PLANTE

Méthodes.

LEBEURIER (1966), FRANCK et HIRTH (1972), ont étudié la multiplication du VMT ou du virus de la mosaïque de la luzerne en fonction de la température sur des disques de feuilles. L'influence de la température sur la multiplication du VMT dans une plante entière a été étudiée par BANCROFT et POUND (1956). Cette influence est complexe, car la température intervient non seulement sur la multiplication virale, mais aussi sur la diffusion du pathogène dans l'hôte, sur le métabolisme de la plante et sur les interactions entre ces différents paramètres.

La concentration en virus dans la plante entière a été estimée par deux méthodes :

— **méthode sérologique.** La teneur en antigène viral est déterminée selon la technique décrite par LEBEURIER (1966), qui est basée sur le dosage des protéines du précipité antigène-anticorps avec la méthode de LOWRY et al. (1951). Cette technique est relativement rapide, mais elle ne permet pas de distinguer les particules infectieuses de celles qui ne le sont pas.

— **estimation du pouvoir infectieux,** soit par la détermination du point de dilution limite (DEP), soit par la détermination de la dilution de l'extrait qui permet d'obtenir 60 % de plants infectés par rapport au nombre de plants contaminés selon la méthode du maximum de vraisemblance (dilution $p = 60$). Cette méthode est longue et nécessite de nombreuses répétitions pour obtenir une estimation correcte, ce qui pose des problèmes matériels.

Teneur en antigène viral dans les hôtes de SCMV-Ampefy cultivés en conditions normales de croissance.

Le SCMV-Ampefy a deux hôtes principaux à Madagascar : la canne à sucre et le maïs. La teneur en antigène viral a été déterminée dans ces deux hôtes dans les conditions les plus favorables à la culture de ces deux plantes, la température variant entre 20° et 32°.

La canne à sucre est une plante à souche pérenne et à tiges annuelles, dont les feuilles peuvent vivre près de six mois. L'âge de la feuille est fonction de sa position sur la tige, à laquelle est attribué un numéro selon le schéma de la figure 35. La figure 36 donne la répartition de la teneur en antigène viral dans chacune des feuil-

les d'une tige appartenant à une souche dans laquelle l'infection est généralisée. Cette teneur augmente très rapidement dans le fuseau des feuilles. Elle est maximale dans les premières feuilles entièrement déroulées où elle dépasse 200 γ d'antigène viral par gramme de feuilles. Puis, la teneur en antigène viral diminue rapidement. Aucun précipité sérologique n'a été obtenu à partir d'extrait de tiges de canne à sucre virosées.

Le maïs est une plante herbacée de cycle relativement court par rapport à la canne à sucre. Sur les jeunes plants, on peut récolter l'ensemble des feuilles qui constituent le bouquet terminal (fig. 37, v. p. 192). On peut ainsi facilement suivre l'évolution de la teneur en antigène viral à partir du moment de l'inoculation du virus dans

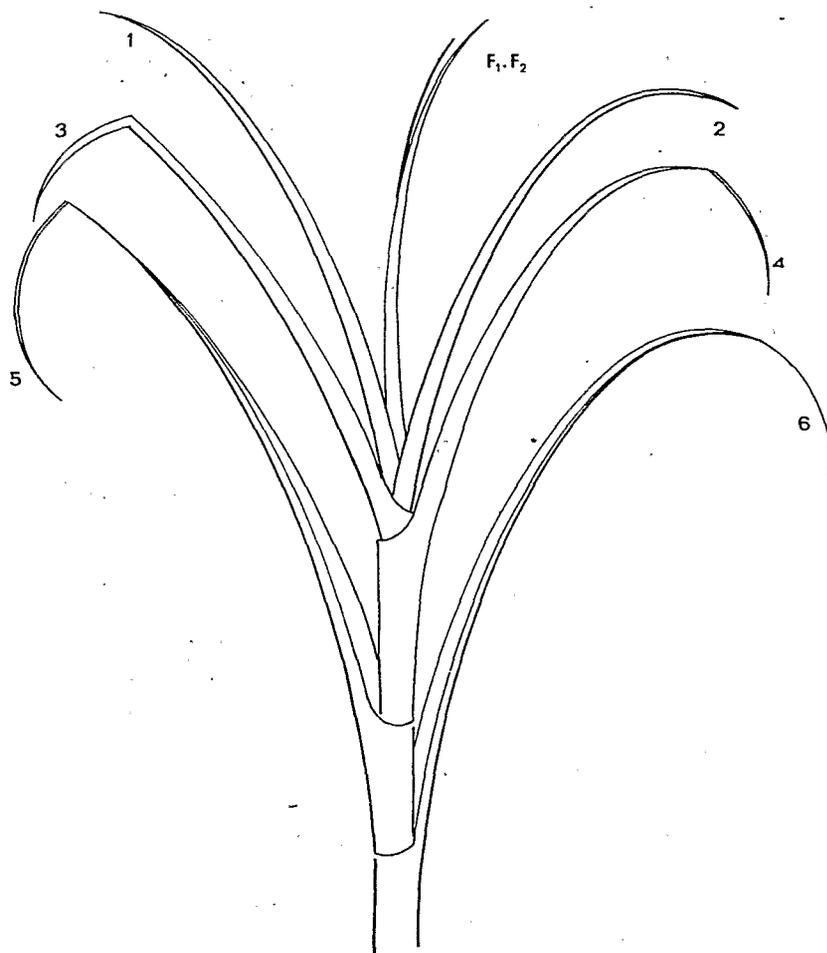


Figure 35.

Position des feuilles d'une tige de canne à sucre : F₁, F₂ feuilles du fuseau central ; 1, 2, 3..., n° de la feuille selon sa position.

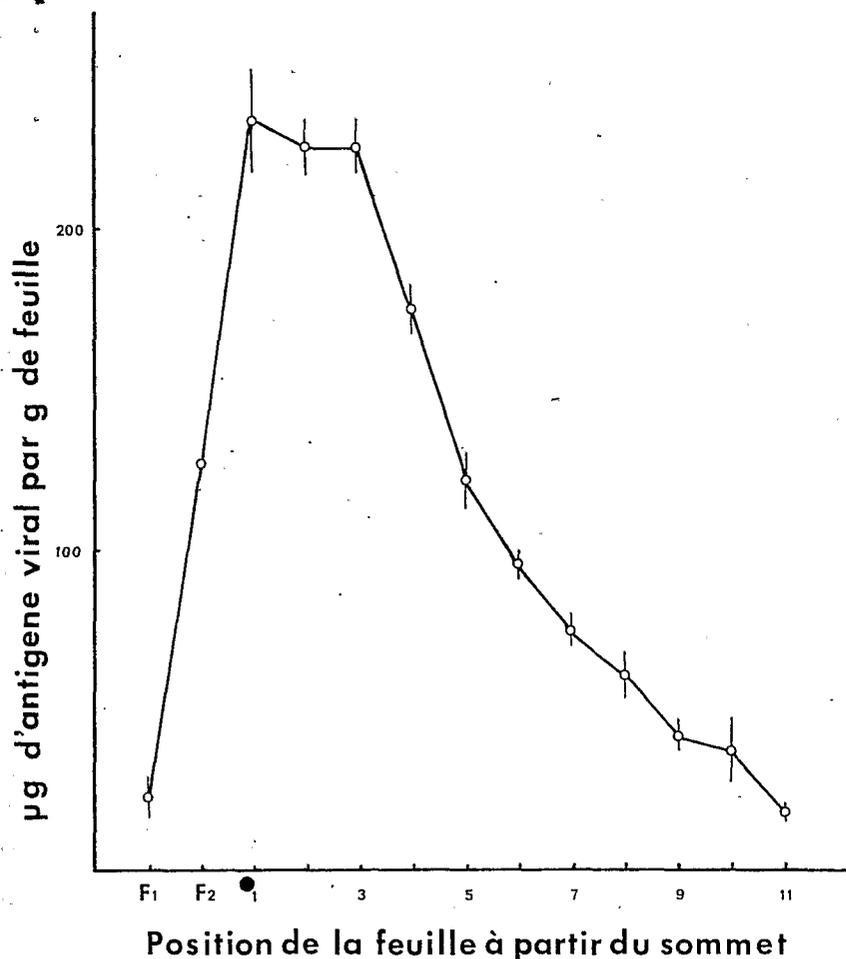


Figure 36.

Teneur en antigène viral des feuilles de canne à sucre, d'après leur position F₁, F₂ : feuilles du fuseau central ; 1, 2, 3..., premières feuilles entièrement déroulées.

la plante. La courbe de la teneur en antigène viral dans les feuilles d'un plant de maïs virosé, variété Dixie 22, est donnée figure 38 (fig. 38, v. p. 193). La teneur en antigène viral augmente jusqu'au quinzième jour qui suit l'inoculation. Elle atteint près de 50 γ par gramme de feuilles, puis elle diminue.

La courbe des teneurs en antigène viral, selon la position des feuilles de canne à sucre, ce qui revient à faire une courbe en fonction de l'âge des feuilles, donc en fonction du temps, a un aspect analogue à celle de la courbe de la teneur en antigène viral dans la masse foliaire du maïs en fonction du temps. Ces teneurs passent par un maximum avant de diminuer fortement avec l'âge des feuilles. Mais la teneur en antigène viral dans les feuilles de canne à sucre est sensiblement plus élevée, plus de quatre fois, que celle des feuilles de maïs dans les mêmes conditions de

température, avec des variations journalières comprises entre 20° et 32°.

Multiplication de SCMV-Ampefy dans des plants de maïs en fonction de la température.

CONDITIONS EXPERIMENTALES

Les maïs, variété Dixie 22, sont semés dans une salle à 25°. Au bout de huit jours, ils sont suffisamment développés pour être inoculés. Ils sont répartis dans des salles à 16°-17°, 20°, 25° et 30°, vingt-quatre heures avant l'inoculation, afin que la température du plant soit bien équilibrée avec la température ambiante. Les plants sont inoculés avec une suspension virale purifiée à 0,02 mg/ml dans le tampon phosphate 0,05 M, pH 7,2. Quatre plants, choisis au hasard, sont récoltés pour constituer un échantillon. Les feuilles inoculées ne sont pas utilisées pour le dosage, l'échantillon

étant constitué des 2-3 ou 4 feuilles de la tête (fig. 37). Pour chaque traitement, deux échantillons sont traités séparément et deux dosages sérologiques ont été faits par échantillon. Les plants destinés au dosage sérologique sont conservés vingt-quatre heures en chambre froide. Les plants destinés à la détermination du pouvoir infectieux sont récoltés juste avant le broyage. Les feuilles sont broyées en présence de 1 ml de tampon phosphate 0,05 M, NaCl 0,9%, pH 7,2, par gramme de feuilles. Les extraits pour le dosage sérologique sont clarifiés par le chloroforme à 20%, puis centrifugés 20 mn à 5.000 g. Une fraction aliquote est alors prélevée pour le dosage sérologique.

TENEUR DES FEUILLES EN ANTIGENE VIRAL

Les courbes de la figure 39 (fig. 39, v. p. 194) donnent la teneur en antigène viral par ml d'extrait de plante.

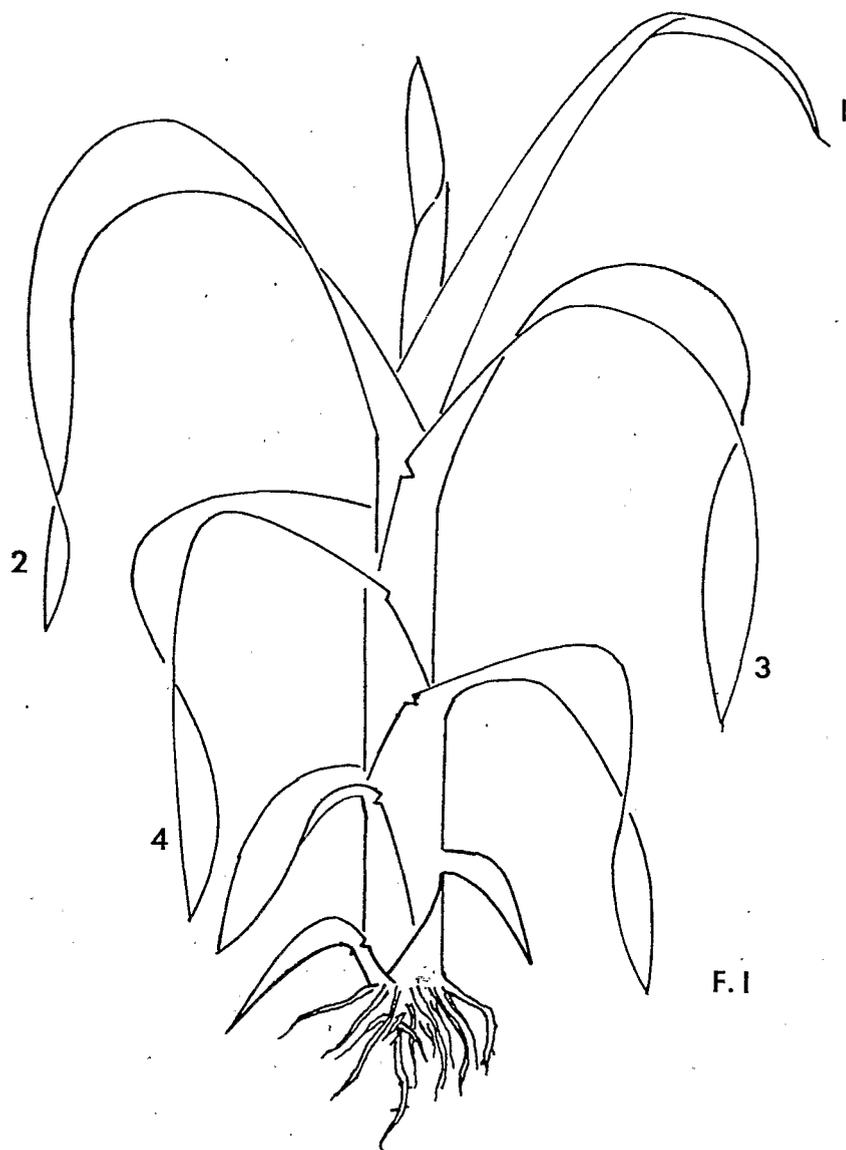
A 30°, la teneur en antigène viral augmente jusqu'au douzième jour, puis diminue. Elle est très faible le vingt-troisième jour. Même à son maximum, la teneur en antigène viral n'est pas très élevée, car elle n'atteint que 15 γ d'antigène viral par ml.

A 25°, la teneur en antigène viral croît pendant les quinze premiers jours, pour atteindre la teneur de 30 γ d'antigène viral par ml. Puis, cette teneur diminue pour se maintenir à un certain niveau qui paraît très variable à partir du vingt-cinquième jour.

A 20°, la teneur en antigène viral croît jusqu'à un maximum obtenu au bout d'une vingtaine de jours, et qui atteint 40 γ d'antigène viral par ml. Quand le maximum est atteint, elle diminue de façon variable, mais reste relativement élevée.

A 16°-17°, la teneur en antigène viral augmente pendant trente jours, pour atteindre la concentration de 60 γ d'antigène viral par ml, puis elle diminue de façon variable, tout en restant à un taux élevé.

Si l'on compare les quatre courbes (fig. 40, v. p. 195), on observe que pendant les quatre premiers jours, la teneur en antigène viral va en décroissant avec la température de 30° et 25° à 20° et 16°-17°. Au huitième jour, cette teneur est équivalente à toutes les températures. Dès le dixième jour, les teneurs en antigène viral tendent à devenir en rapport inverse de la température. Après le vingtième jour, cette teneur continue à croître à 16°-17°, pour atteindre le maximum absolu. Après un certain temps de multiplication (vingt jours à 25°, vingt-cinq jours à 20°, trente-cinq jours à 16°-17°) la teneur en antigène viral a tendance à diminuer.



F. I - Feuille inoculée

1,2,3,4 - Feuilles récoltées

Figure 37.

Plant de maïs âgé d'une trentaine de jours.
F₁ : Feuille inoculée, 1, 2, 3, 4 : feuilles récoltées.

QUANTITE D'ANTIGENE VIRAL
DANS LA MASSE FOLIAIRE
D'UN PLANT DE MAIS

La quantité totale d'antigène viral est fonction de la concentration des extraits et de la quantité d'extrait obtenue, qui dépend de la croissance

du maïs, donc de la température. Le poids de la masse foliaire du maïs est donné figure 41 (fig. 41, v. p. 195).

La quantité d'antigène viral rapportée par plant de maïs en fonction de la température est donnée figure 42 (fig. 42, v. p. 196).

A 30°, la quantité globale d'antigène viral augmente jusqu'au vingtième jour. Mais ensuite, la teneur paraît diminuer, malgré la formation d'une nouvelle feuille.

A 25°, la quantité globale d'antigène viral augmente de manière proche de celle observée à 30°. A partir du vingtième jour, la quantité globale d'antigène viral paraît diminuer.

A 20°, la quantité globale d'antigène viral est inférieure à celles obtenues à 25° et à 30° pendant les quinze premiers jours. Mais la multiplication virale se poursuit, et dépasse la quantité obtenue à 25°.

A 16°-17°, la quantité globale d'antigène rattrape dès le quatorzième jour celles obtenues à 25° et 30°. Cette quantité augmente jusqu'au vingt-cinquième jour, où elle atteint près de deux fois la teneur obtenue à 20°, trois fois celles obtenues à 25° et 30°.

Pouvoir infectieux d'extraits de feuilles de maïs en fonction de la température.

Les points de dilution limite des extraits infectieux, sont donnés, tableau XXXVIII. Le point de dilution limite est du même ordre à 15° et à 20° pendant toute la durée de l'expérience. La dilution limite est plus faible à 25° après le vingtième jour. A 30°, la dilution limite n'est plus que 1/40 au trentième jour; et au quarantième jour, le pouvoir infectieux est très faible, puisque le point de dilution limite est de 1/20. A partir du vingtième jour, le pouvoir infectieux ne se maintient pas à 30°.

Le pouvoir infectieux peut être évalué d'après la dilution ($p = 60$). L'évolution du pouvoir infectieux de la masse foliaire de plants de maïs cultivés à 15°, 20°, 25° et 30° est donnée à la figure 43 (fig. 43, v. p. 195). Les extraits ont été préparés en éliminant les feuilles inocuées. A 15° et 20°, le pouvoir infectieux des extraits de feuilles est du même ordre de grandeur. Il atteint le maximum dès le dixième jour, puis il se maintient jusqu'en fin d'expérience à 20°. Il est plus faible à 15° après le vingtième jour.

A 25°, le pouvoir infectieux est élevé dès le quatrième jour. Il diminue fortement le trentième jour. A 30°, le pouvoir infectieux est moins élevé le dixième et le vingtième jour que celui de maïs virosés cultivés aux températures inférieures. Au vingtième et au quarantième jour, il est très faible et il faut des extraits vingt fois plus concentrés que ceux provenant d'une salle infestés.

Tableau XXXVIII

POINT DE DILUTION LIMITE D'EXTRAITS INFECTIEUX OBTENUS PAR BROYAGE DE FEUILLES DE MAIS, VARIETE DIXIE 22, EN FONCTION DE LA TEMPERATURE DE CROISSANCE DES PLANTS

Conditions de température	Nombre de jours après l'inoculation				
	4 j	10 j	20 j	30 j	40 j
30°		1/1.280	1/ 640	1/ 40	1/ 20
25°	1/2.560	1/2.560	1/1.280	1/ 320	1/ 640
20°	1/ 80	1/2.560	1/1.280	1/1.280	1/ 640
15°		1/2.560	1/1.280	1/2.560	1/ 640

Tableau XXXIX

POINT DE DILUTION LIMITE D'EXTRAITS INFECTIEUX OBTENUS PAR BROYAGE DES DEUX PLUS JEUNES FEUILLES DE MAIS, VAR. DIXIE 22, VIROSES, CULTIVES A DIFFERENTES TEMPERATURES

Conditions de température	Nombre de jours après l'inoculation				
	4 j	10 j	20 j	30 j	40 j
30°		1/1.280	1/1.280	1/ 320	1/ 20
25°	1/2.560	1/2.560	1/2.560	1/2.560	1/2.560
20°	1/ 80	1/2.560	1/1.280	1/2.560	1/2.560
15°		1/2.560	1/1.280	1/2.560	1/1.280

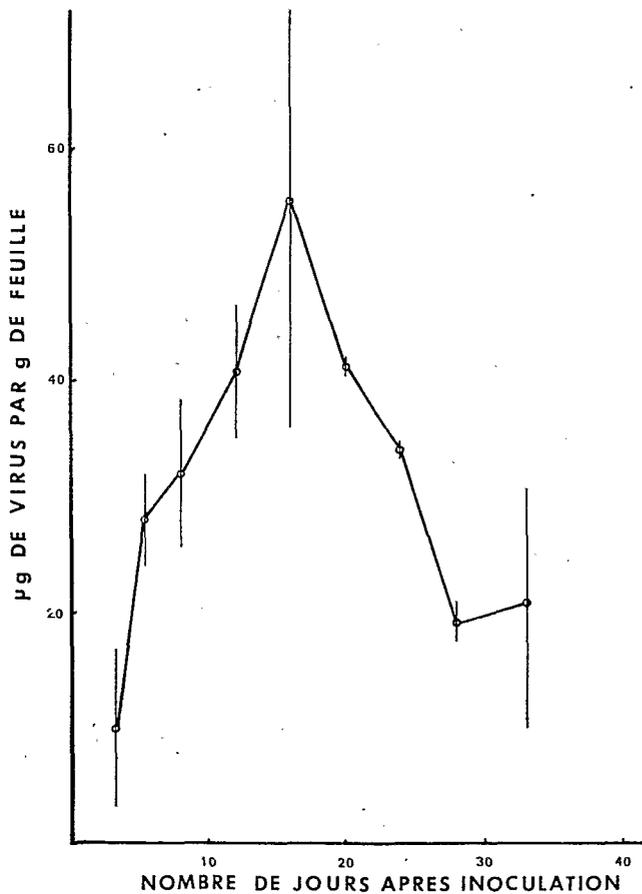


Figure 38.

Teneur en antigène viral d'un plant de maïs, variété Dixie 22, en fonction du nombre de jours après l'inoculation, à une température comprise entre 20° et 35°.

A 25°, les symptômes réapparaissent sur les deux plus jeunes feuilles néoformées, même s'ils disparaissent des feuilles plus âgées. Le point de dilution limite d'extraits virosés préparés à partir des deux plus jeunes feuilles d'un plant a donc été déterminé pour être comparé au point de dilution limite de la masse foliaire (tableau XXXIX). La dilution limite est du même ordre sur les deux plus jeunes feuilles aux trois températures de 25°, 20° et 15° et du même ordre que celle obtenue à partir de la masse foliaire des maïs à 15° et 20° (soit 1/2.560). Mais à 30°, à partir du trentième jour, elle n'est plus que de 1/320. Au quarantième jour, le pouvoir infectieux est également très faible puisque la dilution limite n'est plus que de 1/20 comme sur toute la masse de feuilles.

Le pouvoir infectieux des deux plus jeunes feuilles d'un plant, est exprimé, en dilution ($p = 60$), figure 44 (fig. 44, v. p. 195).

A 15°, 20° et 25°, le pouvoir infectieux des deux feuilles supérieures des plants de maïs virosés est du même ordre. Toutefois, le maximum est atteint dès le quatrième jour à 25°, alors qu'il est atteint le dixième jour à 20°. A 30°, le pouvoir infectieux des extraits des deux plus jeunes feuilles des plants de maïs virosés est très faible comme celui de la masse foliaire de la même plante.

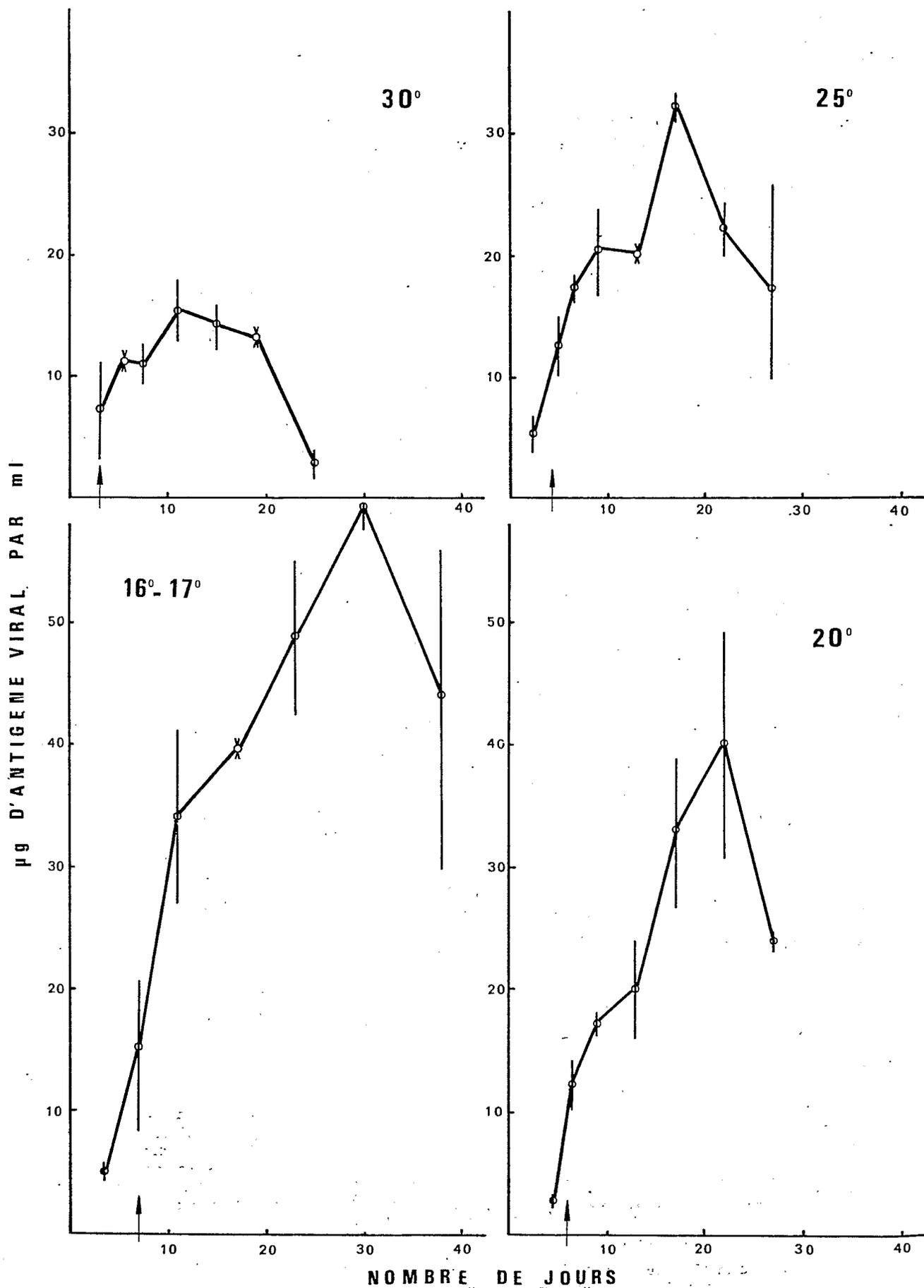


Figure 39

Variation de la teneur en antigène viral en fonction du temps dans des extraits de feuilles de maïs, variété Dixie 22, inoculés par SCMV-Ampefy, placés dans des salles à différentes températures. Premiers symptômes.

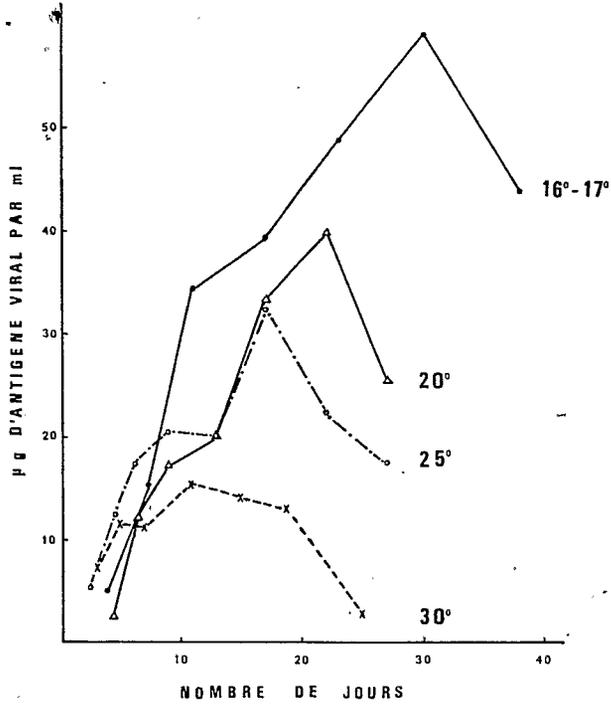


Figure 40.

Comparaison des teneurs en antigène viral d'extraits de feuilles de maïs, variété Dixie 22, inoculés par SCMV-Ampefy, selon la température.

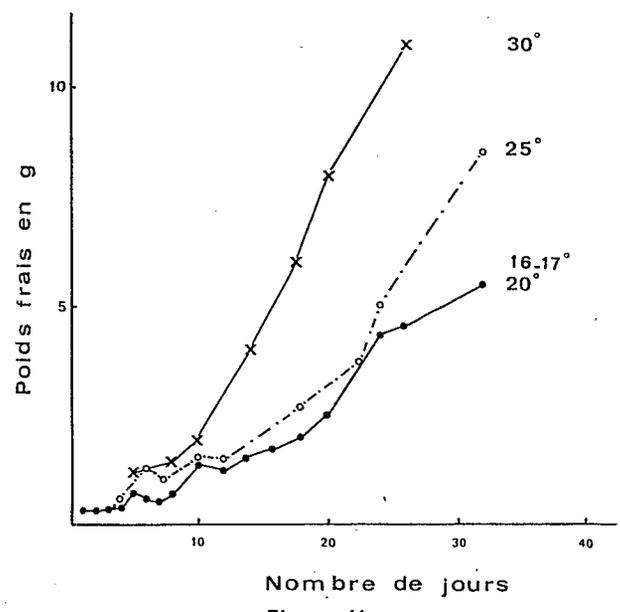


Figure 41.

Evolution du poids frais de la masse foliaire d'un plant de maïs, variété Dixie 22, en fonction du temps à différentes températures.

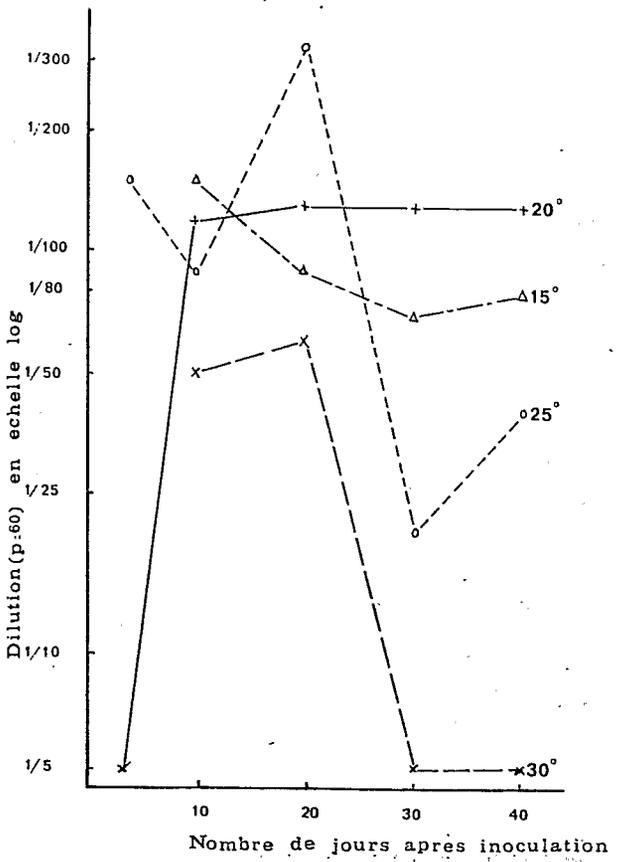


Figure 43.

Pouvoir infectieux en fonction de la température d'extraits de feuilles de maïs, variété Dixie 22, virosés, en solution dans du tampon phosphate 0,05 M pH 7,2.

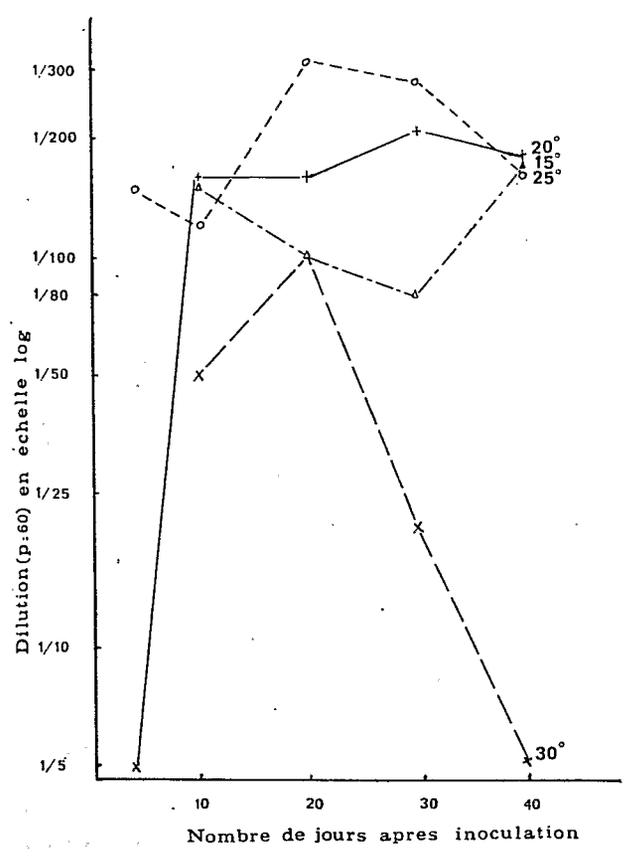


Figure 44.

Pouvoir infectieux, en fonction de la température, d'extrait des deux plus jeunes feuilles de plants virosés de maïs, variété Dixie 22, en solution dans du tampon phosphate 0,05 M pH 7,2.

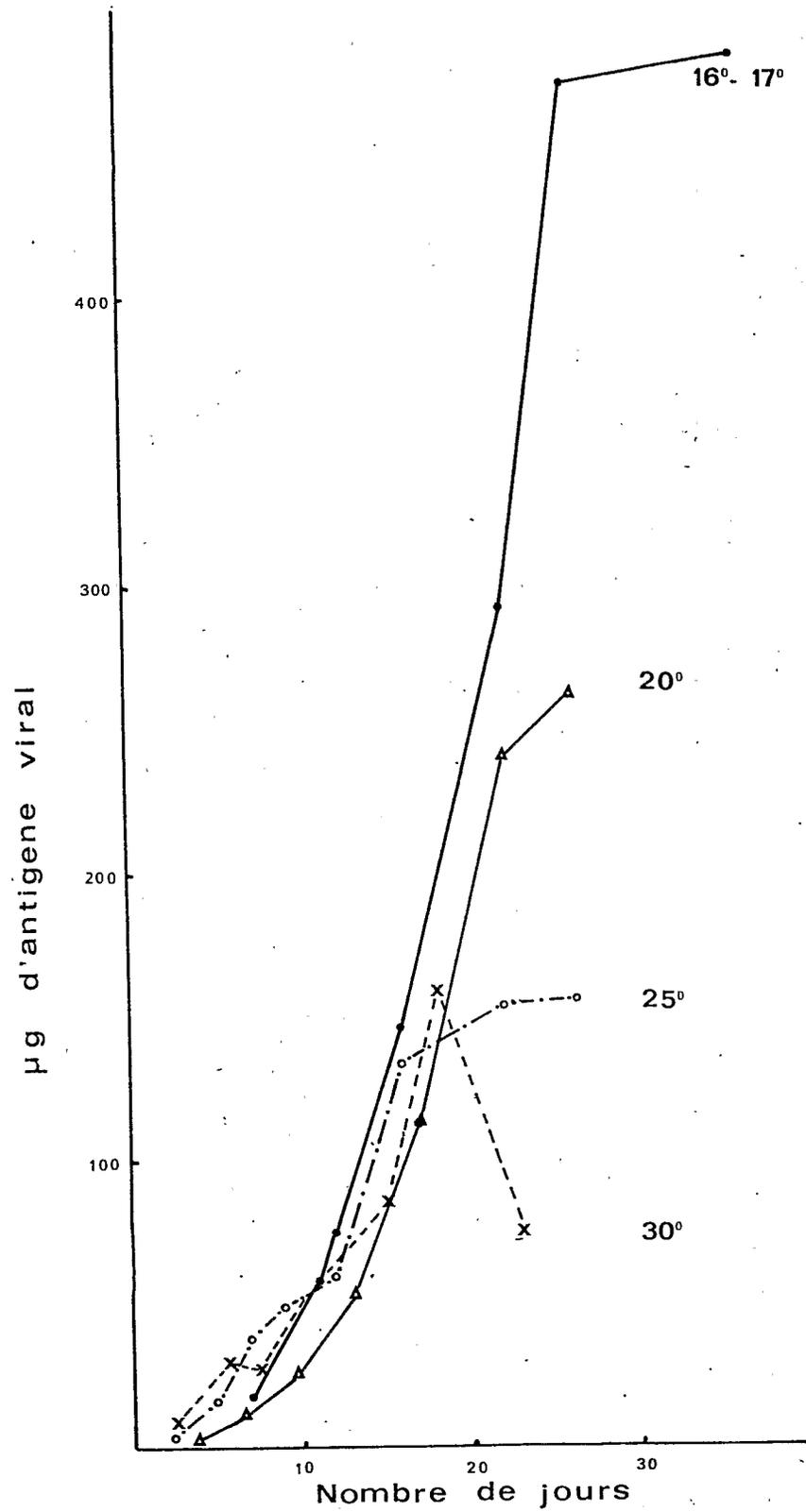


Figure 42.

Quantité globale d'antigène viral dans la masse foliaire de plants de maïs, variété Dixie 22, en fonction du temps à différentes températures.

IV. CONCLUSIONS

La température joue un rôle important sur le temps d'apparition des symptômes sur le maïs inoculé par SCMV-Ampefy. Plus la température est élevée, entre 15° et 30°, plus le temps qui s'écoule avant l'apparition des symptômes est court. C'est un fait assez général pour les virus des végétaux. Dans une gamme de températures permettant la croissance normale de l'hôte, les symptômes apparaissent d'autant plus rapidement que la température est plus élevée (KASSANIS, 1957).

Par contre, le virus ne se multiplie pas dans certains plants en dessous de 25°, le pourcentage de plants qui restent sains est faible, mais il ne paraît pas dû au hasard. Ce phénomène pourrait être rapproché du fait que l'on observe également une plus grande hétérogénéité dans le temps d'apparition des symptômes aux températures inférieures à 25°. En étudiant un système synchrone de multiplication du VMT, souche U, en fonction de la température, DAWSON, SCHLEGEL et LUNG (1975) ont montré que les basses températures (5° et 12°) inhibent les premières étapes de la multiplication virale. Aux températures étudiées les plus basses, 15° et 16°-17°, la multiplication de SCMV-Ampefy ne paraît pas ralentie, mais peut être inhibée dans certains plants, puisqu'il n'y a pas de multiplication lorsqu'on transfère ces plants à température plus élevée.

A 25° et 30°, les symptômes sont peu sévères et disparaissent assez rapidement sur les feuilles atteintes. Après une vingtaine de jours, on ne peut les observer que sur les deux ou trois plus jeunes feuilles des plants laissés à 25°. Par contre, à 15°, 16°, 17° et 20°, les symptômes sont très nets et ne disparaissent pas. La souche SCMV-Ampefy se différencierait donc du MDMV-A qui induit la formation de symptômes de plus en plus nets quand la température s'élève de 15° à 26,5° (TU et FORD, 1969). La disparition des symptômes aux températures élevées n'est pas un fait isolé puisqu'elle a déjà été signalée pour d'autres virus, tel le VMT (JOHNSON, 1921).

L'examen des courbes de la teneur en antigène viral et de la variation du pouvoir infectieux permet de distinguer trois zones de températures :

— une zone optimale entre 16° et 20°. La multiplication virale paraît se dérouler selon une courbe exponentielle (fig. 40 et fig. 42). A partir de vingt-cinq à trente jours, la teneur en antigène viral n'augmente plus. Le virus reste stable *in vivo* puisque le pouvoir infectieux des virions reste sensiblement le même tout au long

de l'expérience. A ces deux températures, les courbes observées ont l'aspect général des courbes de multiplication virale des virus à température optimale (LEBEURIER et HIRTH, 1966).

— une zone intermédiaire autour de 25°. Malgré une augmentation plus rapide du poids frais des échantillons (fig. 41), la teneur globale d'antigène reste inférieure à celle obtenue aux températures de 16° et 20°. A partir du vingtième jour, le pouvoir infectieux diminue dans la plante (fig. 43), mais il se maintient dans les deux plus jeunes feuilles (fig. 44). Les symptômes de la virose disparaissent également à cette période.

— une zone supra-optimale à 30°. A cette température, la courbe de multiplication du virus est sensiblement la même qu'à 25° (fig. 42) et ceci jusqu'au dix-huitième jour. La chute en antigène viral est alors très nette : elle est précédée de la disparition des symptômes. Le virus n'est pas stable à cette température dans toutes les feuilles de la plante.

L'augmentation en poids frais du maïs est plus importante à 30° qu'aux autres températures. Toutefois, cette température continue n'est pas optimale pour une croissance harmonieuse de la plante. Par contre, les autres températures sont plus favorables à la croissance et au développement du maïs, bien qu'elles soient continues. A ces températures (15° à 26,5°) le taux de multiplication de MDMV-A monte avec le taux de croissance de la plante (TU et FORD, 1968). Une augmentation du taux de croissance du maïs est donc compatible avec celle du taux de multiplication d'un virus voisin. Les températures supérieures à 20° étant défavorables à la multiplication de la souche SCMV-Ampefy dans le maïs, ce virus peut donc être assimilé à une souche psychrophile.

Les différents hôtes de SCMV ont besoin d'une alternance de température comprise entre 15° et 35° pour se développer normalement. Ceci explique pourquoi cette souche psychrophile peut amorcer son développement dans ses hôtes. Le comportement de cette souche correspondrait à celui d'une souche froide du VMT, isolée par LEBEURIER (1966).

CHAPITRE V

ETUDE AGRONOMIQUE DE LA MALADIE A MADAGASCAR

I. EXTENSION DE LA MALADIE

La mosaïque de la canne à sucre n'a pas été observée à Madagascar jusqu'en 1952, alors qu'elle était con-

nue dans les îles voisines des Comores (BOURIQUET, 1946) et de La Réunion (KOPP et d'EMMEREZ DE CHARMOY, 1932), ainsi qu'au Natal (STOREY, 1924). En 1952, une épidémie de mosaïque a été signalée dans la région de Brickaville, sur la côte Est de Madagascar, où les dégâts dus à deux maladies, mosaïque et échaudement des feuilles ont été estimés considérables (BARAT, 1953). La variété en grande culture était alors la variété Otahiti-Lousier, *Saccharum officinarum* pur. La maladie n'avait pas encore envahi la région de Tamatave, au Nord de Brickaville, mais par contre, elle a été signalée à la même époque dans les régions de Namakia et de Marovoay, sur la canne à sucre M 72-31 qui est une canne hybride de *S. spontaneum* avec trois retours sur *S. officinarum*. Cette variété n'a pas été sélectionnée contre la mosaïque, car la maladie n'est pas présente dans son pays d'origine. Les dégâts sur M 72-31 ont été insignifiants (BARAT, 1953). La lutte contre la mosaïque et l'échaudement des feuilles à Brickaville a consisté en la multiplication d'une variété très résistante aux deux maladies, M 134-32. Les rendements ont alors beaucoup augmenté (BARAT, 1954; LAUFFENBURGER, 1960). Sur la côte Ouest, le renouvellement normal des variétés a été accompagné de la disparition de

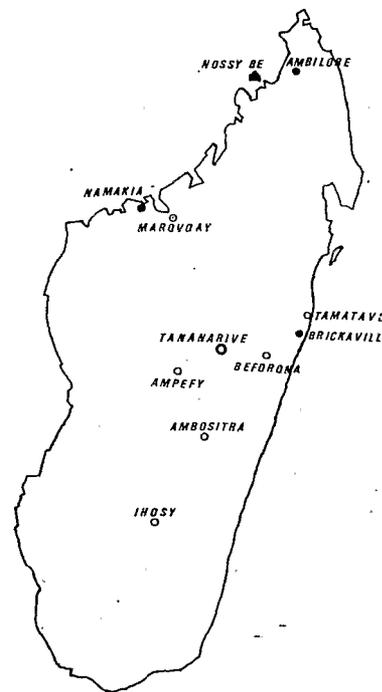


Figure 45.

Répartition à Madagascar des lieux cités et des industries sucrières.

O : lieux cités
● : zone industrielle de culture de canne à sucre.

la maladie. Pourtant, une des variétés les plus appréciées entre 1952 et 1960 était une variété sensible à la mosaïque, la B 34-104. Une autre variété, NCo 310, sensible à SCMV-B et SCMV-H, occupe toujours une place très importante. La virose n'a plus été observée sur les cultures industrielles de canne.

Aucune transmission de la maladie au maïs n'a été obtenue à partir d'extrait de feuilles des variétés NCo 310, B 37-172 et S 17 cultivées sur grandes superficies à Ambilobe et Namakia. Aucun précipité sérologique n'a été obtenu. Dans les mêmes régions, la maladie n'a pas été mise en évidence dans les petites cultures de variété Lousier que l'on trouve abondamment dans les villages. En 1971, une prospection dans l'Ouest et le Sud de Madagascar, dans les nombreuses petites cultures familiales plantées en *S. officinarum* n'a pas permis d'observer de symptômes de mosaïque, ni d'obtenir d'infection. Par contre, cette maladie s'est maintenue dans les cultures familiales sur les hauts plateaux malgaches. Elle a été ainsi identifiée en 1964 à Ampéfy, en 1966 à Ambositra, Ihosy, dans les cultures familiales plantées en variétés indéterminées. La région d'Ampéfy, l'une des plus riches des hauts plateaux était contaminée à 100%. En 1968, il n'y avait plus de plante saine dans toute la sous-préfecture de Miarynarivo dont dépend Ampéfy, d'une superficie pourtant supérieure à celle de quatre départements français. Les cultivateurs abandonnaient d'eux-mêmes la canne à sucre, malgré son intérêt pour la consommation directe, la production de sucre artisanal « *Siramamy gasy* », de vin de canne ou d'alcool, en raison de ce qu'ils appelaient la « dégénérescence de la plante ». En direction de la côte Est, la maladie a été reconnue près de Beforona, à 800 mètres d'altitude. Malgré des contrôles très stricts de l'état sanitaire des champs organisé par le Service de la Défense des Cultures, la mosaïque n'a plus été mise en évidence sur la côte Est. Mais, contrairement à la côte Ouest, la variété Lousier a été éliminée à cause de sa sensibilité à la maladie de Fidji dans la région de Brickaville.

Les divers isollements de mosaïque (Beforona, Ambositra, Ihosy), ont montré les mêmes propriétés biologiques et sérologiques que SCMV-Ampéfy, ainsi qu'une souche en provenance de l'île Mayotte.

Une épidémie de mosaïque sur maïs a sévi dans la même région d'Ampéfy en 1969 et 1970. La plupart des cultivateurs se sont plaints du mauvais état sanitaire de leurs cultures.

Divers symptômes douteux ont été observés sur les cultures fourragères.

Aucune transmission mécanique, ni précipité sérologique n'ont été obtenus à partir d'extraits bruts de ces plantes.

II. TRANSMISSION

La transmission de la maladie ne se fait pas par inoculation mécanique dans la nature. L'infection primaire se fait par l'intermédiaire d'un grand nombre de pucerons dont *Rhopalosiphum maydis*, Fitch (BRANDES, 1920), *Aphis gossypii*, Glov. (LAWAS et FERNANDEZ, 1949), et *Myzus persicae*, Sulz. (ANZALONE et PIRONE, 1964). Ces insectes sont bien connus sur les cultures à Madagascar (BRENIERE et DUBOIS, 1965). Deux sont présents sur canne à sucre, *R. maydis* en saison humide, et *M. persicae* en saison sèche (APPERT, 1967). *R. maydis* peut se multiplier très intensément sur les graminées : canne à sucre, maïs, sorgho et graminées sauvages. En particulier, la face inférieure des feuilles de maïs et de sorgho est très fréquemment recouverte d'un tapis de larves de *R. maydis* par temps de pluie (fig. 46). Les cultivateurs, d'ailleurs, assimilent la maladie sur le maïs à la pullulation de l'insecte, ce qui, dans le cas de cette plante, n'est pas inexact.



Figure 46.

Pullulation à la face intérieure d'une feuille de sorgho de *Rhopalosiphum maydis* Fitch, au stade larvaire.

Le SCMV peut être transmis par le sol (BOND et PIRONE, 1970). La pénétration doit se faire par les blessures

des bases des tiges et non par les racines (MOLINE et FORD, 1974).

La transmission par boutures et tout matériel de plantation, joue probablement le rôle principal pour l'extension de la maladie dans le cas de la canne à sucre. La région d'Ampéfy a été contaminée à 100% par ce mode de reproduction, les paysans replantant leur champ avec leur propre matériel. Si la maladie a été introduite à Madagascar entre 1945 et 1950, il a suffi de vingt ans pour que la culture soit devenue impossible dans cette vaste région.

La transmission de la mosaïque par graines de maïs est possible à un taux très faible. Sur 948 graines prélevées sur des plants atteints de mosaïque, 3 plants ont montré une forte chlorose due à la mosaïque dès la germination. Ce taux de 4% est du même ordre que celui donné par le MDMV (SHEPHERD, 1965). Ce taux est pourtant suffisant aux USA pour assurer le transport sur grandes distances de la maladie, et provoquer de nouvelles épidémies. A Madagascar, la présence générale de canne à sucre, variétés de *Saccharum officinarum*, joue un rôle plus important que la transmission par graines de maïs dans la conservation de la maladie d'une saison à l'autre, en particulier dans la sous-préfecture de Miarynarivo.

III. REPARTITION CLIMATIQUE DE LA MALADIE

Le grand foyer de mosaïque se trouve en altitude, sur les hauts plateaux centraux, avec un foyer à faible altitude en direction de la côte Ouest. D'après RAVET (1948), ces régions ont une température annuelle moyenne inférieure à 25° (fig. 47). La moyenne des maxima ne dépasse pas 30°, par contre, la moyenne des minima descend en dessous de 16°. Ces conditions climatiques sont en accord avec les températures optimales de multiplication de SCMV-Ampéfy.

La région industrielle de Brickaville a une température moyenne inférieure à 25°. La moyenne des minima est de 20°, et la moyenne des maxima reste en dessous de 30°. Les conditions de température sont assez proches de celles d'Ampéfy.

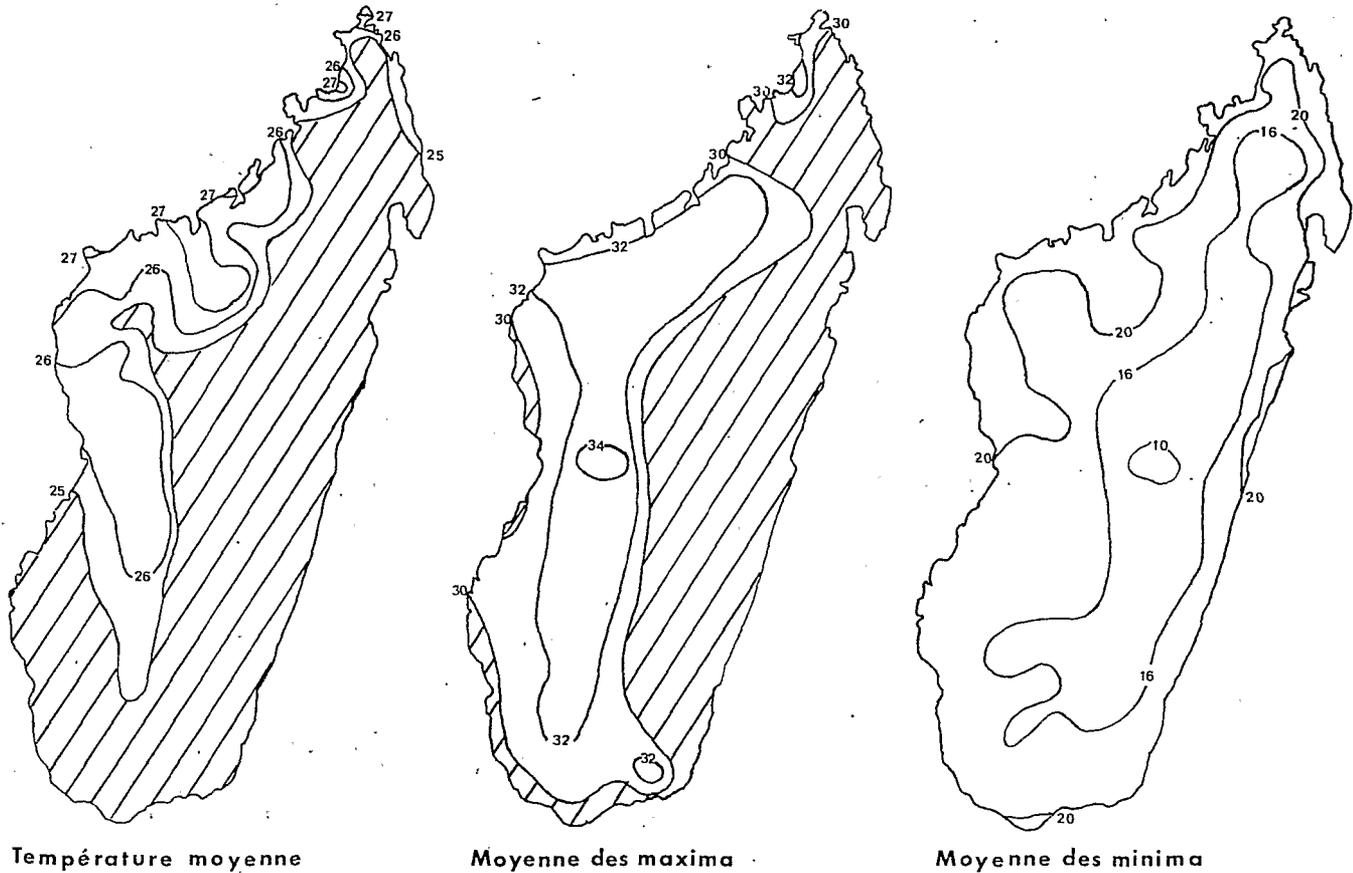
Les régions industrielles de Namakia et d'Ambilobe-Nosy Be sont beaucoup plus chaudes. La température moyenne annuelle y est de 27°. La moyenne des minima est supérieure à 20° et la moyenne des maxima supérieure à 32°. Pendant un mois, la température moyenne est supérieure à 28°. Ces conditions de température sont élevées par rapport aux températures optimales de développement de la souche virale SCMV-Ampéfy.

La variété sensible est uniformément répandue dans toute l'île. L'insecte vecteur se multiplie aussi abondamment dans les régions côtières que sur les hauts plateaux. Sa pullulation est favorisée par les températures élevées. Le foyer de la maladie se maintient néanmoins sur les hauts plateaux.

La température est un des facteurs importants pour le développement des viroses dans une plante (KASSANIS, 1957). Les températures élevées ont, en général, un effet curatif. Il paraît donc logique de trouver un développement plus intense de la virose dans les zones les plus fraîches de Mada-

gascar, ce qui est concordant avec les résultats obtenus chapitre IV, tout en n'oubliant pas que d'autres facteurs climatiques ou physiologiques peuvent intervenir dans le développement d'une maladie.

ISOTHERMES ANNUELLES



Température moyenne

Moyenne des maxima

Moyenne des minima

Figure 47

Températures annuelles à Madagascar, d'après RAVET (1948).

IV. MOYENS DE LUTTE

La lutte contre la mosaïque de la canne à sucre à Madagascar se présente sous divers aspects :

Lutte contre l'épidémie de mosaïque dans la région d'Ampety.

Devant l'extension de l'épidémie de mosaïque dans la préfecture de l'Itasy, il importait de renouveler très rapidement le matériel végétal. Les *Saccharum officinarum* étant évidemment déconseillés, il a fallu choisir des cannes hybrides présentant les mêmes qualités, en particulier en ce qui

concerne le goût et une teneur en fibres assez faible pour permettre l'utilisation artisanale de ces cannes. Deux variétés répondent à ce critère : M 31-45 et S 17. Après l'échec de la transmission mécanique du virus à ces nouvelles variétés, les boutures ont été distribuées à quelques planteurs de l'Itasy par l'intermédiaire du Service de la Défense des Cultures. Six ans après (1974), ces deux variétés se sont multipliées très rapidement dans toute la région, sans opération de vulgarisation particulière. Aucun symptôme de mosaïque n'a été observé sur les nouvelles cultures jusqu'à présent.

De nouvelles épidémies de mosaïque sur le maïs n'ont pas été signalées depuis 1970.

Protection des cultures de canne à sucre des régions côtières vis-à-vis d'un foyer de mosaïque dans Madagascar.

Le foyer épidémique constitué par les cultures très disséminées de *S. officinarum*, variété Otahiti-Lousier, peut poser un problème aux producteurs de sucre. En culture industrielle, les variétés hybrides cultivées sont, en principe, résistantes si le pays producteur a pu sélectionner contre les

souches SCMV-A, B ou D. C'est le cas général, sauf pour l'île Maurice. En culture paysannale, on trouve encore beaucoup de variété Otahiti-Lousier. Cependant, l'instabilité du virus de la mosaïque à des températures supérieures ou égales à 30° paraît rendre peu probable une extension de la maladie vers l'Ouest de Madagascar (fig. 47). On a toutefois intérêt à planter la variété S 17, résistante en culture paysannale.

Dans la sous-préfecture de Brickaville, les variétés cultivées actuellement sont résistantes à la mosaïque, car elles ont été sélectionnées dans leur pays d'origine pour leur résistance à SCMV-A, B ou D. Le choix variétal n'est pas libre dans cette région en raison de la maladie de Fidji et la variété Otahiti-Lousier y est proscrite.

Il ne faut pas introduire à Madagascar de variétés de canne à sucre sensibles à SCMV-A qui paraît la souche la plus proche de SCMV-Ampefy.

Recherche de variétés résistantes de maïs et de sorgho.

Le contrôle de la résistance du maïs et du sorgho peut se faire très simplement par inoculation mécanique, selon la technique déjà décrite. Quatre pots par variété peuvent contenir 40 plants, ce qui paraît suffisant.

Les variétés de sorgho vulgarisées jusqu'en 1972 sont résistantes : Kafir 29-49 G, TM 11, Wad Akir n'ont pas manifesté de symptômes. Akol 2 et Bazaï 2 donnent des nécroses locales et sont résistantes par hypersensibilité.

Le problème est plus ardu pour le maïs, en raison de son allogamie. Sans renouvellement annuel des semences, une variété nouvelle retournera rapidement au stade de population. Les populations locales de maïs actuellement cultivées sur les hauts plateaux sont sensibles à la mosaïque avec une grande homogénéité (100% des plants inoculés montrent de la mosaïque). La recherche de variétés résistantes ne peut qu'être intégrée dans un program-

me d'ensemble de sélection variétale et de production de semences.

Protection de Madagascar contre l'introduction de souches étrangères de SCMV.

Toutes les variétés de canne à sucre présentes à Madagascar ont été introduites. Pour satisfaire les besoins de la sélection, une vingtaine de nouvelles variétés sont introduites annuellement. Ce chiffre est insuffisant pour assurer tous les objectifs de la sélection. Actuellement, une entreprise sucrière manque de nouvelles variétés pour ses essais agronomiques, les dernières variétés reconnues résistantes à la maladie de Fidji ayant dix ans. En accord avec la réglementation internationale de la Convention Phytosanitaire Inter Africaine (IAPSC), les introductions sont soumises à une quarantaine en serre protégée des insectes, dont les modalités ont été précisées par BARAT (1959). Les variétés nouvellement introduites sont cultivées deux ans en serre de quarantaine, soit une culture en « vierge » et une première repousse. L'observation de la première repousse est considérée comme nécessaire pour la détection de la mosaïque et l'échaudement des feuilles. Puis, les variétés sont multipliées en quarantaine externe, les boutures étant traitées par thermothérapie pour éliminer l'éventuelle maladie du rabougrissement des repousses, et enfin multipliées pour obtenir le matériel végétal nécessaire aux essais. L'industrie sucrière prend donc un retard de quatre ans par rapport au pays fournisseur de la variété.

Nombreuses sont les maladies de la canne à sucre qui passent par boutures. Mises à part la maladie du rabougrissement des repousses et les stries chlorotiques que l'on peut détruire par thermothérapie, ces maladies donnent des symptômes nets dès la reprise de la végétation. Par contre, de nombreux symptômes dus à toutes sortes de troubles physiologiques peuvent être confondus avec la mosaïque. C'est pourquoi l'observation de la première repousse est conseillée. Beaucoup de variétés sont détruites en

serre par peur de mosaïque, aggravant encore le retard imposé ainsi à l'industrie.

Le schéma de quarantaine semble pouvoir être simplifié de la façon suivante :

— plantation en serre vitrée, pour éviter notamment la sortie de spores de champignons. En cours de quarantaine, on peut contrôler la mosaïque selon les possibilités, par inoculation mécanique au sorgho Tx 412 qui, à 25°, montrera des symptômes en huit jours pour les souches de SCMV-A, B, D, E, H et I, ainsi que pour MDMV-A, ou bien par contrôle sérologique, la méthode la plus précise et la plus pratique étant celle au latex de BERCKS.

— après huit mois, on doit pouvoir disposer de boutures convenables pour la thermothérapie (trois heures à 50°), et pour la multiplication. Il n'est pas utile de prolonger la quarantaine pour des raisons phytosanitaires car, à partir de six mois de croissance, aucun symptôme ne peut se manifester sur une canne dont la phase de croissance rapide est terminée. La thermothérapie éliminera les risques de transmission de la maladie du rabougrissement des repousses et des stries chlorotiques. Mais le traitement, déjà dangereux pour la germination des boutures, n'est pas suffisant contre le SCMV (ANTOINE, 1960).

Au cours de la multiplication suivante, la mosaïque peut encore être détectée au stade le plus jeune par sérologie.

A Madagascar, on peut préparer un immunosérum qui assure le contrôle des souches de SCMV-A, B et D. Si l'on redoute des introductions de MDMV ou de SCMV-H de l'importante collection de Canal Point, il paraît possible d'introduire l'immunosérum correspondant avec les boutures suspectes.

Un contrôle sérologique de la mosaïque dans les grandes collections de canne à sucre devrait pouvoir permettre l'établissement d'un certificat international garantissant un maximum de précautions concernant au moins la mosaïque.

CONCLUSION

La souche SCMV-Ampefy, qui affecte les cultures de canne à sucre des hauts plateaux de Madagascar, a des propriétés biologiques et sérologiques proches de celles de la souche SCMV-A décrite aux USA (SNAZELLE et al., 1971). Malgré l'extension géographique de la maladie dans la grande île, aucune autre souche, de propriétés séro-

logiques différentes ou induisant sur les mêmes hôtes des symptômes différents, n'a été identifiée. Les hôtes sensibles aux diverses souches de SCMV ou de MDMV répondent à l'inoculation de SCMV-Ampefy par une réaction de tout ou rien, comme pour SCMV-A, SCMV-H et MDMV-A. Les autres souches, SCMV-B, SCMV-D et

SCMV-E provoquent une grande hétérogénéité dans les manifestations des symptômes chez les plantes d'une même variété (SNAZELLE et al., 1971). La souche SCMV-Ampefy nous paraît donc relativement homogène, au moins en ce qui concerne l'expression de ses propriétés biologiques.

I. PARTICULARITES PHYSICO-CHIMIQUES

La souche SCMV-Ampefy a été purifiée par une technique mettant en jeu les procédés qui évitent au maximum l'agrégation du virus, et lui conservent ses propriétés biologiques : emploi de l'EDTA, du mercaptoéthanol, de la chromatographie sur gel, peu d'ultra-centrifugations. Sa structure et ses propriétés physico-chimiques sont en accord total avec ce qui est connu des virus du groupe des Flexiviridales de la classification LHT (LWOFF, HORNE et TOURNIER, 1962) ou des potyvirus définis par HARRISON et al. (1971) : particules filamenteuses à symétrie hélicoïdale, avec un pas de l'hélice de 3,4 nm, des particules infectieuses de 750 nm de long et de 14 nm de diamètre, un point d'inactivation thermique (TIP) de 56°. Par contre, quelques particularités ont été observées par rapport à ce qui est décrit pour d'autres souches de SCMV ou de MDMV :

— La concentration en antigène viral atteint, dans les meilleures conditions, 100 µg/ml d'extrait de maïs, soit 100 mg/l. Cette concentration peut atteindre dans *Saccharum officinarum* 200 µg/g de feuilles, soit au minimum 200 mg/l, sinon plus. Si l'ensemble de l'antigène correspond à des virions, ces concentrations sont largement supérieures aux concentrations classiques de potyvirus (5 à 25 mg/l d'extrait brut, d'après HARRISON, 1971).

— La souche SCMV-Ampefy s'agrége suffisamment en présence d'un tampon à pH 4,5 pour que l'on puisse la sédimenter par une centrifugation à 8.000 g. Or, TOSIC et al. (1974), proposent de purifier les souches SCMV-A, B, D et E et MDMV-A par clarification des extraits de plantes à pH 4,8. Ces souches restent en suspension dans le surnageant de centrifugation à 8.000-10.000 g, alors que le SCMV-Ampefy doit sédimenter. Toutefois, les souches australiennes de SCMV ne peuvent être convenablement purifiées si le pH descend en dessous de 6 en cours de purification (TEAKLE et GRILLIS, 1973). Une étude systématique du point iso-électrique des nucléoprotéines des différentes souches de SCMV et de MDMV permettrait sans doute de déceler des propriétés particulières à ces virus.

II. STABILITE DU VIRUS EN FONCTION DE LA TEMPERATURE

Comme pour tous les autres virus du groupe PVY, le point d'inactivation thermique d'un extrait brut de plante virosée est relativement bas *in vitro* : 56°. De même, le pouvoir infectieux d'une préparation purifiée n'est con-

servé qu'à 4°. D'autre part, lors d'électrophorèse de zone, réalisée à 29°-30°, le virion paraît se dissocier en ARN et protéine. Ces propriétés sembleraient indiquer que les interactions ARN-protéine de la souche SCMV-Ampefy sont faibles, et que la coque protéique n'assure pas une protection très efficace, contrairement à d'autres virus de même symétrie, tels les tobamovirus. L'instabilité à la température de la souche SCMV-Ampefy est un caractère général des potyvirus (HARRISON et al., 1971).

III. INFLUENCE DE LA TEMPERATURE SUR LA MULTIPLICATION DU VIRUS DANS LES PLANTES

In vivo, la souche SCMV-Ampefy a le comportement d'une souche psychrophile. La multiplication virale à 16°-17°, bien que retardée lors des premiers stades de la virose, est en fait intense. Aux températures supérieures à 25°, la multiplication est plus rapide, mais le virus néosynthétisé n'est pas stable.

La répartition géographique de la maladie à Madagascar permet de suggérer une hypothèse complémentaire en ce qui concerne la multiplication du virus dans les conditions naturelles. Sur les hauts plateaux du centre de l'île, la température journalière alterne de 15° à 32°. Ainsi, au cours de chaque journée, il y aurait une température qui conviendrait à l'une des phases de la multiplication virale. Par contre, dans les deltas de la côte Ouest, où la température moyenne est supérieure à 26° pendant trois mois, conditions très favorables à la culture des plantes hôtes, le virus ne serait pas suffisamment stable pour que la maladie se maintienne. La souche SCMV-Ampefy ne provoque ainsi d'épidémies que dans les régions les plus froides de l'île qui sont encore propices à la culture de la canne à sucre et du maïs.

La psychrophilie de la souche SCMV-Ampefy pourrait expliquer les nombreux cas de guérison observés dans les champs de canne à sucre de certaines régions chaudes de Madagascar. Ce phénomène de guérison a été observé dans des contrées du monde où les conditions climatiques sont voisines de celles de la grande île. La canne à sucre peut s'affranchir du virus de la mosaïque en quarante-cinq jours ou plus, sans que cela lui confère l'immunité (FORBES et MILLS, 1943; SUMMERS, BRANDES et RANDS, 1948; ABBOTT et TIPPETT, 1966). Les cannes à sucre, comme d'autres plantes, peuvent donc être guéries par thérapie appliquée à la plante entière.

IV. RELATIONS ENTRE SCMV-AMPEFY ET LES SOUCHES AMERICAINES DE SCMV ET DE MDMV

Les relations entre souches virales sont généralement établies d'après deux critères principaux : la réponse d'une gamme d'hôtes à l'infection, et les parentés sérologiques.

Les souches SCMV-A, B, D, H et I et de MDMV (A et B) ont été décrites d'après les symptômes observés sur la canne à sucre pour les premières, sur le maïs et *Sorghum halepense* pour les secondes. Elles ont été décrites d'après la manifestation des relations hôtes-virus, qui sont très dépendantes de l'environnement. En fait, ce ne sont pas des souches de virus qui ont été décrites, mais des maladies de plantes induites par ces souches. Dans le même environnement, les divers symptômes de viroses sur une même plante ont permis de reconnaître des souches virales différentes. Mais les variations de symptômes décrits sur une même plante et provoqués par deux souches différentes peuvent être plus modérées que celles induites par une même souche lorsqu'il y a changement d'environnement. En particulier, l'absence de symptômes après l'inoculation peut être aussi bien interprétée comme une résistance favorisée par les conditions de milieu (résistance horizontale) que comme une immunité vis-à-vis de la souche (résistance verticale).

Les sorghos à nécroses locales permettent de distinguer la souche SCMV-Ampefy des autres souches de SCMV et de MDMV. En particulier, on peut différencier SCMV-Ampefy, comme SCMV-A, des souches SCMV-B, SCMV-D et SCMV-E qui, d'après SNAZELLE et al. (1971), constituent un même sérotype.

Les nécroses se produisent sur des sorghos qui manifestent un caractère nécrotique à transmission manufacturielle. Mais, parmi ces sorghos, certains présentent des infections généralisées à des températures auxquelles d'autres ne montrent que des nécroses locales. Le caractère nécrotique ne paraît donc pas lié à la localisation du virus, mais le type de nécrose dépend de l'étendue du traumatisme dû à l'infection virale. Le phénomène nécrotique paraît être commandé par la plante, mais la localisation dépend d'un autre système que l'on met en évidence par l'intermédiaire des souches virales. De semblables systèmes ont été observés sur le VMT : les tabacs qui comportent dans leur génotype le gène N, donnent des nécroses locales avec toutes les souches du VMT. Par contre, le génotype viral intervient dans la réaction de *Nicotiana*

sylvestris qui est hypersensible à certaines souches de VMT et montre des infections généralisées avec d'autres (KADO et KNIGHT, 1968). L'inoculation de SCMV-Ampefy à des sorghos nécrotiques permet donc d'observer l'ensemble des phénomènes liés à l'hypersensibilité déclenchée par une infection virale et peut probablement constituer un système intéressant pour leur étude.

V. IMPORTANCE AGRONOMIQUE DE LA SOUCHE SCMV-AMPEFY

L'analogie de SCMV-A et de SCMV-Ampefy est confirmée aussi bien par les parentés sérologiques que par le pouvoir pathogène. Ces souches sont différentes de SCMV-H et de MDMV-A.

Cette distinction est très importante : les maladies dues à SCMV-A, SCMV-H et MDMV-A sont très différentes sur les divers points suivants :

— les hôtes : aucune épidémie grave sur le maïs ou le sorgho n'a encore été rapportée à SCMV-A, alors que la souche MDMV-A a entraîné d'importants dégâts sur ces plantes aux USA ;

— les variétés de canne à sucre et le programme de sélection : parmi les géniteurs de variétés hybrides de canne à sucre, seules les variétés de *Saccharum officinarum* sont très sensibles à SCMV-A. De nombreuses cannes hybrides sont résistantes à SCMV-A. Les techniques de sélection de variétés résistantes sont bien au point. Les problèmes de sélection sont plus difficiles avec SCMV-H et SCMV-I ;

— les types et l'importance des dégâts : selon chaque variété, les dégâts dépendent de la souche en cause. En général, SCMV-A est la souche qui provoque les dégâts les moins importants sur les variétés sensibles à plusieurs souches (BREAUX et DUNCKELMAN, 1969).

A Madagascar, la maladie paraît limitée par les conditions de température. Par contre, il est indispensable d'éviter d'introduire d'autres souches de SCMV. Les techniques proposées doivent permettre d'augmenter l'efficacité du contrôle des introductions de nouvelles variétés végétales, tout en rendant ces contrôles beaucoup plus rapides, afin de ne pas entraîner de retard dans les programmes variétaux, retards qui pourraient être encore plus dangereux que la maladie elle-même.

BIBLIOGRAPHIE

- ABBOTT (E.V.), 1949. — Comparison of method for artificially inoculating sugar cane seedlings with the mosaic virus. *Phytopathology*, 39, 668-9.
- ABBOTT (E.V.), 1952. — Stability of strains of the sugarcane mosaic virus. *Phytopathology*, 42, 281.
- ABBOTT (E.V.), 1953. — Tolerance to dilution and heat of six strains of the sugarcane mosaic virus. *Proc. Inter. Soc. Sugar Cane Technol.*, 8, 911-3.
- ABBOTT (E.V.), 1958. — Strains of sugarcane mosaic virus in Louisiana. *Sugar Bull.*, 37, 49-51.
- ABBOTT (E.V.), 1961. — A new strain of sugarcane mosaic virus. *Phytopathology*, 51, 642.
- ABBOTT (E.V.), 1961. — Mosaic in Mar'in (J.P.), Abbott (E.V.) and Hughes (C.). Sugarcane diseases of the world. *Elsevier Publ. Co.*, Amsterdam, 1, 407-30.
- ABBOTT (E.V.), 1962. — Problems in sugar cane disease control in Louisiana. *Proc. Inter. Soc. Sugar Cane Technol.*, 11, 685-8.
- ABBOTT (E.V.), CHARPENTIER (L.J.), 1962. — Additional insect vectors of sugar cane mosaic. *Proc. Inter. Soc. Sugar Cane Technol.*, 11, 755-60.
- ABBOTT (E.V.), STOKES (I.E.), 1966. — A world survey of sugar cane mosaic virus strains. *Sugar y Azucar*, mars 1966.
- ABBOTT (E.V.), TIPPETT (R.L.), 1964. — Additional hosts of sugarcane mosaic virus. *Plant Disease Reporter*, 48, 443-5.
- ABBOTT (E.V.), TIPPETT (R.L.), 1966. — Strains of sugar cane mosaic virus. US Department of Agriculture. *Techn. Bull.*, n° 1340, 25 p.
- ABBOTT (E.V.), ZUMMO (N.), TIPPETT (R.L.), 1965. — Methods of testing sugar cane varieties for disease resistance at the US sugar cane field station, Houma, Louisiana. *Proc. Inter. Soc. Sugar Cane Technol.* 12, 1138-42.
- ANTOINE (R.), 1960. — The thermotherapy of sugar cane plants infected with Chlorotic Streak disease. *Rev. Agric. et sucrière, Ile Maurice*, 39, 321-7.
- ANZALONE (L.), GIMALVA (M.), CHILTON (J.P.), 1967. — Methods used to select disease resistant varieties of sugar cane at the Louisiana State University. *Proc. Inter. Sugar Cane Technol.*, 12, 81-3.
- ANZALONE (L.), LAMEY (H.A.), 1968. — Possible differential reaction of certain rice varieties to sugar cane mosaic virus. *Plant Disease Reporter*, 52, 775-7.
- ANZALONE (L.), PIRONE (T.P.), 1964. — Transmission of sugar cane mosaic virus by *Myzus persicae*. *Plant Disease Reporter*, 48, 984-5.
- APPERT (J.), 1967. — Les insectes nuisibles aux cultures de Madagascar. *L'Agronomie tropicale*, numéro spécial 22, 176 p.
- BAIN (D.C.), 1944. — The use of abrasives for inoculating sugar seedlings with the mosaic virus. *Phytopathology*, 34, 844-5.
- BALTZ (T.), 1972. — Contribution à l'étude de la protéine du virus du rabougrissement buissonneux de la tomate. Thèse, Université de Strasbourg, 48 p.
- BANCROFT (J.B.), POUND (G.S.), 1956. — Cumulative concentrations of tobacco mosaic virus in tobacco and tomato at different temperatures. *Virology*, 2, 29-43.
- BANCROFT (J.B.), ULLSTRUP (A.J.), MESSIEHA (M.), BRACKER (C.E.), SNAZELLE (T.E.), 1966. — Some biological and physical properties of a midwestern isolate of maize dwarf mosaic virus. *Phytopathology*, 56, 474-8.
- BARAT (H.), 1953. — Présence de la mosaïque de la canne à sucre à Madagascar. *Atti del VI° Congresso internazionale di Microbiologia*, Roma 6-12 sept. 1953, 3, 399-400.
- BARAT (H.), 1954. — Note sur la présence de la maladie de Fidji à Madagascar. *Congr. Prot. Végétaux*, Marseille, 230.
- BARAT (H.), 1959. — Quarantine of sugar cane imported into Madagascar. *Proc. Intern. Soc. Sugar Cane Technol.*, 10, 1025.
- BAUDIN (P.), 1970. — La Mosaïque de la canne à sucre à Madagascar. *Terre Malgache*, 8, 197-200.
- BAUDIN (P.), 1971. — Influence du pH sur le virus de la Mosaïque de la canne à sucre. *C. R. Soc. Biol.*, 65, 5, 1205-9.
- BAUDIN (P.), VUITTENEZ (A.), 1972. — Application de la méthode au latex de Berks au diagnostic du virus de la Mosaïque de la canne à sucre. *C.R. Soc. Biol.*, 166, 491-4.
- BERCKS (R.), 1967. — Methodische Untersuchungen über den serologischen Nachweis pflanzenpathogener viren mit dem Bentonit-Flockungstest, dem Latex test und dem Bariumsulfatstest. *Phytopathologische Zeitschrift*, 58, 1-17.
- BERCKS (R.), QUERFURTH (G.), 1971. — The use of the latex test for the detection of distant serological relationships among plant viruses. *J. Gen. Virol.*, 12, 25-32.
- BEST (R.J.), 1936. — Studies on a fluorescent substance present in plant. *Australian J. Exptl. Biol. Med. Sci.*, 14, 199.
- BOND (W.P.), PIRONE (T.P.), 1970. — Evidence for soil transmission of sugarcane mosaic virus. *Phytopathology*, 60, 437-40.
- BOND (W.P.), PIRONE (T.P.), 1971. — Purification and properties of sugarcane mosaic virus strains. *Phytopathology Z.*, 71, 56-65.
- BOURIQUET (G.), 1946. — Les maladies des plantes cultivées à Madagascar. Le Chevallier, Paris, 520 p.
- BRASSE (M.K.), 1970. — Systemic infections to the assay of plant viruses. *Ann. Rev. Phytopathol.*, 8, 61-84.
- BRASSE (M.K.), VAN PELT (N.), 1970. — Properties of infectious ribonucleic acid from wheat streak mosaic. *Virology*, 42, 690-705.
- BRANDES (E.W.), 1920. — Artificial and insect transmission of sugar cane mosaic virus. *J. Agr. Res.*, 19, 131-8.
- BRANDES (E.W.), 1927. — Sugar cane mosaic. *Proc. Intern. Soc. Sugar Cane Technol.*, 2, 83-5.
- BRANDES (E.W.), BERCKS (R.), (1965). — Gross morphology and serology as a basis for classification of elongated plant viruses. *Adv. Virus Res.*, 11, 1-24.
- BRANDES (E.W.), WETTER (C.), 1959. — Classification of elongated plant viruses on the basis of particle morphology. *Virology*, 8, 99-115.
- BREAUX (R.D.), DUNCKELMAN (P.H.), 1969. — Variety and mosaic strains interactions in sugar cane. *Sugar y Azucar*, 32.
- BRENIERE (J.), DUBOIS (J.), 1965. — Catalogue des insectes nuisibles aux cultures malgaches. IRAM, Doc. n° 43, 170 p.

- BRENNER (S.), HORNE (R.W.), 1959. — A negative staining method for high resolutions electron microscopy of viruses. *Biochem. Biophys. Acta*, 34, 103-10.
- CERIOTTI (G.), 1955. — Determination of nucleic acids in animal tissues. *J. Biol. Chem.*, 214, 59-70.
- CHONA (B.L.), 1944. — Sugar cane mosaic and its control. *Indian Farming*, 5, 174-8.
- COCKERHAM, 1958. — Proc. 3rd Conf. Potato Virus diseases, Lisse-Wageningen, 1957, 199-203. H. Velnam and Zonen, Wageningen.
- COSTA (A.S.), PENTEADO (M.P.), 1951. — Corn seedlings as test plants for the sugar cane mosaic virus. *Phytopathology*, 41, 758-63.
- DALE (J.L.), 1964. — Isolation of a mechanically transmissible virus from corn in Arkansas. *Plant Disease Reporter*, 48, 661-3.
- DAMIDARGH (I.S.), SHEPHERD (R.J.), 1970. — Purification of Tobacco Etch and other viruses of the Potato Y group. *Phytopathology*, 60, 132-42.
- DAWSON (W.O.), SCHLEGEL (D.E.), LUNG (M.C.Y.), 1975. — Synthesis of Tobacco Mosaic Virus in intact tobacco leaves systemically inoculated by differential temperature treatment. *Virology*, 65, 563-73.
- DEAN (J.L.), 1970. — A local lesion host for strain E of the sugar cane mosaic virus. *Phytopathology*, 60, 569-70.
- DEAN (J.L.), COLEMAN (O.H.), 1959. — Necrotic and resistant reactions to the sugar cane mosaic virus in sorghum. *Plant Disease Reporter*, 43, 522-7.
- DEAN (J.L.), COLEMAN (O.H.), 1967. — Screening sugar cane seedlings for mosaic resistance by mechanical inoculation. *Proc. Congr. Intern. Soc. Sugar Cane Technol.*, 12, 1188-93.
- DIJKSTRA (T.), GRANCINI (P.), 1960. — Serological and electron microscopical investigations of the relationships between the sorghum red stripe virus and sugar cane mosaic virus. *Tijdsch. Plantenziekten*, 66, 295-300.
- FINNEY (D.J.), 1952. — Probit Analysis-University Press, Camb., 318 p.
- FLOR (H.H.), 1955. — Host parasite interaction in flax rust, its genetics and other implications. *Phytopathology*, 45, 680-5.
- FOLIN (O.), CICALTEU (U.), 1927. — On tyrosine and tryptophane determinations in protein. *J. Biol. Chem.*, 73, 627-50.
- FORBES (I.L.), MILLS (P.J.), 1943. — Disappearance of virus from mosaic diseased sugar cane plants. *Phytopathology*, 33, 713-8.
- FRANCK (A.), HIRTH (L.), 1972. — Isolement et propriétés d'une souche thermophile du virus de la Mosaïque de la luzerne. *C.R. Acad. Sc. Paris*, 274, 745-8.
- FURAMOTO (W.A.), MICKEY (R.), 1970. — Mathematical analysis of the interference phenomenon of TMV. *Virology*, 40, 322-8.
- GIERER (A.), SCHRAMM (B.), 1956. — Infectivity of ribonucleic acid from tobacco mosaic virus. *Nature*, 177, 702.
- GILLASPIE (A.G.), 1967. — Maize dwarf mosaic virus recovered from commercial varieties of sugar cane. *Plant Disease Reporter*, 51, 761-3.
- GILLASPIE (A.G.), 1972. — Sugar cane mosaic virus: Purification. *Proc. Inter Soc. Sugar Cane Technol.*, 14, 951-70.
- GILLASPIE (A.G.), KOIKE (H.), 1973. — Maize dwarf mosaic virus susceptibility in parental lines of sugar cane. *Phytopathology*, 63, 442.
- GILLASPIE (A.G.), KOIKE (H.), 1973. — Sugar cane mosaic virus and maize dwarf mosaic virus in mixed infections of sugar cane and other grasses. *Phytopathology*, 63, 1300-6.
- GOIDANICH (G.), 1939. — Ricerche sulperimento del Sorgo-zuccherino verificatosi in Italia nella primavera del 1936. *Boll. Staz. Patol. veg.*, Roma, NS, 39, 1-74.
- GOLD (A.H.), MARTIN (J.P.), 1955. — Electron microscopy of particles associated with sugar cane mosaic. *Phytopathology*, 45, 694.
- GORDON (D.T.), GINGERY (R.E.), 1973. — Purification of maize dwarf mosaic virus by continuous flow centrifugation. *Phytopathology*, 63, 1386-92.
- GRANADOS (R.R.), 1969. — Maize viruses and vectors, in Maramorosch (K.). Viruses, vectors and vegetation, Interscience Pb, N.Y., 327-59.
- GRANCINI (P.), 1957. — Un mosaico del mais e del sorgo in Italia. *Maydica*, 2, 83-104.
- HALVORSON (H.D.), ZIEGLER (N.R.), 1933. — Application of statistics to problems in bacteriology. I-A: Means of determining bacterial population by the dilution method. *J. Bacteriol.*, 25, 101-21.
- HARRIS (J.I.), HINDLEY (J.), 1961. — The protein subunit of turnip yellow mosaic virus. *J. Mol. Biol.*, 3, 117-20.
- HARRISON (B.D.), FINCH (J.T.), GIBBS (A.J.), HOLLINGS (M.), SHEPHERD (R.J.), VALENTA (V.), WETTER (C.), 1971. — Sixteen groups of plant viruses. *Virology*, 45, 356-63.
- HEDRICK (J.L.), SMITH (A.J.), 1968. — Size and charge isomer separation and estimation of molecular weights of proteins by disc gel electrophoresis. *Arch. Biochem. Biop.*, 126, 155-64.
- HEROLD (F.), WEIBEL (J.), 1963. — Electron microscopic demonstration of sugar cane mosaic virus particles in cells of *Saccharum officinarum* and *Zea mays*. *Phytopathology*, 53, 469-71.
- HILL (J.H.), FORD (R.E.), BENNER (H.I.), 1972. — Characterization of the maize dwarf mosaic virus strain B protein. *Phytopathology*, 62, 764.
- HILL (J.H.), FORD (R.E.), BENNER (H.I.), 1973. — Purification and partial characterization of maize dwarf mosaic virus strain B (sugar cane mosaic virus). *J. Gen. Virol.*, 20, 327-39.
- HIRTH (L.), 1971. — Comparative properties of rod-shaped viruses. In Kurstak (E.) and Maramorosch (K.), Comparative Virology. Academic Press, 360-85.
- HITCBORN (J.H.), THOMSON (A.D.), 1960. — Variation in plant viruses. *Advances in Virus Research*, 7, 163-87.
- HOLMES (F.O.), 1941. — A distinctive strain of tobacco mosaic virus from *Plantago*. *Phytopathology*, 31, 1089-98.
- HOLMES (F.O.), 1958. — A single gene resistance test for viral relationship as applied to strains of spotted-wilt virus. *Virology*, 5, 382-90.
- HOLMES (F.O.), 1965. — Genetics of pathogenicity in viruses and of resistance in host plants. *Advances in Virus Research*, 11, 139-61.
- HORECKER (B.L.), MA (T.S.), HAAS (S.), 1940. — Note on the determination of microquantities of phosphorus. *J. Biol. Chem.*, 136-175.
- JEAN (Jong-Ho), SEHGAL (O.P.), 1969. — Factors affecting local lesion assay of maize dwarf mosaic virus on *Sorghum bicolor*. *Phytopathology*, 59, 1507-12.
- JOHNSON (J.), 1921. — The relation of air temperature to certain plant diseases. *Phytopathology*, 11, 446-58.
- JONES (R.K.), TOLIN (S.A.), 1972. — Factors affecting purification of maize dwarf mosaic virus from corn. *Phytopathology*, 62, 812-5.
- KADO (C.I.), KNIGHT (C.A.), 1966. — Location of a local lesion gene in Tobacco Mosaic Virus RNA. *Proc. of Nat. Acad. of Science US*, 55, 1276-83.
- KASSANIS (B.), 1957. — Effects of changing temperature on plant virus diseases. *Advances in Virus Research*, 4, 221-41.
- KERLAN (C.), LAPIERRE (M.), MOREAU (J.P.), 1974. — Observations sur l'apparition du virus de la Mosaïque nanisante du maïs. *Ann. Phytopathol.*, 6, 455-70.
- KHURANA (P.), SINGH (S.), 1972. — Sugar cane mosaic virus in India. *Sugarcane Phytopathol. Newsletters*, 7, 24-7.
- KLINKOWSKI (M.), 1968. — Pflanzliche virologie. Die viren des europäischen raumes. Akademik verlag, Berlin, 457 p.
- KLUG (A.), BERGER (J.E.), 1964. — An optical method for the analysis of periodicities in electron micrographs, and some observations on the mechanism of negative staining. *J. Mol. Biol. G.B.*, 10, 565-8.
- KOENIG (R.H.), STEGEMANN (H.), FRANKSEN (H.), PAUL (H.L.), 1970. — Protein subunits in the Potato Virus X group. Determination of the molecular weights by polyacrylamide electrophoresis. *Biochem. Biop. Acta*, 207, 184-9.
- KOPP (A.), d'EMMEREZ DE CHARMOY (D.), 1932. — Situation actuelle de la Mosaïque de la canne à sucre à La Réunion. Travaux Techniques de la Station Agronomique de l'île de La Réunion. Bull. n° 3.
- LANGENBERG (W.G.), 1973. — Serology, physical properties and purification of unaggregated infectious maize dwarf mosaic virus. *Phytopathology*, 63, 149-54.
- LAUFFENBÜRGER (G.), 1960. — La lutte contre la maladie de Fidji de la canne à sucre à Madagascar. *Rev. Agric. et Sucri.*, île Maurice, 39, 198-219.
- LAWAS (O.M.), FERNANDEZ (W.L.), 1949. — Sugar cane mosaic virus transmission. *Philippines agriculturist*, 32, 31.
- LEBEURIER (G.), 1966. — Action de la température sur le développement de diverses souches du virus de la Mosaïque du tabac. Thèse Fa. Sc., Strasbourg, 210 p.
- LEBEURIER (G.), HIRTH (L.), 1966. — Effect of elevated temperatures on the development of two strains of tobacco mosaic virus. *Virology*, 29, 385-95.
- LIORZOU (P.), 1964. — Initiation pratique à la statistique. Eyrolles, Paris, 279 p.
- LIU (H.P.), LI (H.W.), 1953. — Studies on the sugar cane mosaic virus in Taiwan. II. The mode of resistance of cane varieties and the wild relatives of cane to strains of mosaic. *Taiwan Sugar Expt. Station Report*, 10, 89-103.
- LOEBENSTEIN (G.), 1964. — Localization and induced resistance in Virus-infected plants. *Ann. Rev. Phytopathol.*, 10, 177-206.
- LOENIG (U.E.), 1969. — The determination of the molecular weight of ribonucleic acid by polyacrylamide-gel electrophoresis. *Biochem. J.*, 113, 131-8.
- LOVISOLO (O.), 1957. — Contributo sperimentales alla conoscenza e alla determinazione del virus agente dell'arrossamento striato del sorgo e di un mosaico del maïs. *Boll. Staz. Pat. Veg.*, Roma, Ser. III, 14, 261-321.
- LOWRY (O.L.), ROSEBROUGH (N.J.), FARR (A.L.), 1951. — Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.*, 193, 265-75.
- LWOFF (A.), HORNE (R.W.), TOURNIER (P.), 1962. — A system of viruses. *Col. Spring Harbour Symp. Quant. Biol.*, 27, 51-5.
- MAC KENZIE (D.R.), 1967. — Studies with maize dwarf mosaic virus from the north-eastern United States. M.S. Thesis, The Pennsylvania State University, University Park, Park, 46 p.

- MAC KENZIE (D.R.), WERNHAM (C.C.), FORD (R.E.), 1966. — Differences of maize dwarf mosaic virus isolates of northeastern United States. *Plant Disease Reporter*, 50, 814-8.
- MAC LAUGHLIN (M.R.), HILL (J.H.), BENNER (M.I.), 1975. — Serological relationships among potyviruses: maize dwarf mosaic virus, tobacco etch virus and turnip mosaic virus. *Phytopathology*, 65, 334-5.
- MARTIN (C.), GALLET (M.), 1966. — Contribution à l'étude de l'action de la température sur la réaction d'hypersensibilité de certains hôtes à l'égard du virus de la Mosaïque du tabac. *C. R. Acad. Sci.*, Paris, 262, 646-9.
- MATTHEWS (R.E.F.), 1957. — Plant virus serology. Cambridge University Press, 128 p.
- MATZ (J.), 1933. — Artificial transmission of sugar cane mosaic. *J. Agric. Res.*, 46, 821-40.
- MATZ (J.), 1938. — Comparative study of sugar cane mosaic from different countries. *Proc. Intern. Soc. Sugar Cane Technol.*, 6, 572-80.
- MIKI (T.), OSHIMA (N.), 1972. — On the size of the protein subunits in potato virus Y. *J. of General Virology*, 15, 179-82.
- MOLINE (H.E.), FORD (R.E.), 1974. — Sugar-cane mosaic virus infection of seedling roots. *Physiological Plant Pathology*, 4, 197-207.
- OSTER (G.), 1951. — The iso-electric points of some strains of TMV. *J. Biol. Chem.*, 190, 55-9.
- OUCHTERLONY (O.), 1958. — Diffusion in gel methods for immunological analysis. *Progr. Allergy*, 5, 1-78.
- PINCK (L.), HIRTH (L.), 1972. — The replication RNA and the viral RNA synthesis rate in Tobacco infected with Alfalfa Mosaic Virus. *Virology*, 49, 413-25.
- PIRONE (T.P.), ANZALONE Jr (L.), 1966. — Purification and electron microscopy of sugar cane mosaic virus. *Phytopathology*, 56, 371-2.
- PLUS (N.), 1954. — Etude de la multiplication du virus de la sensibilité au gaz carbonique chez la Drosophile. *Bull. Biol.*, France et Belg., 88, 248-93.
- PORTNER (C.), HOGL (C.), REINBOLT (J.), 1952. — Structure primaire des peptides tryptiques solubles de la protéine du virus de la Mosaïque jaune du navet. Thèse Fac. Sc., Strasbourg, 101 p.
- POUND (G.), WALKER (J.C.), 1945. — Differentiation of certain crucifer viruses by the use of temperature and host immunity reactions. *J. Agric. Res.*, 71, 255-78.
- PRING (D.R.), LANGENBERG (W.G.), 1972. — Preparation and properties of maize dwarf mosaic virus ribonucleic acid. *Phytopathology*, 62, 253-5.
- RAVET (J.), 1948. — Atlas climatologique de Madagascar. Publication du Service Météorologique de Madagascar, no 10.
- REICHMANN (M.E.), 1959. — Potato Virus X. II. Preparation and properties of purified, non aggregated virus from tobacco. *Canadian J. of Botany*, 37, 4-10.
- REICHMANN (M.E.), 1959. — Potato Virus X. III. Light scattering studies. *Canadian J. of Botany*, 37, 384-8.
- REICHMANN (M.E.), STACE-SMITH (R.), 1959. — Preparation of infectious ribonucleic acid from Potato Virus X by means of Guanidine denaturation. *Virology*, 9, 710-1.
- ROSS (A.F.), 1951. — Systemic acquired resistance induced by localised virus infections in plants. *Virology*, 14, 340-58.
- SAMUEL (G.), 1931. — Some experiments on inoculating methods with plant viruses and on local lesions. *Ann. Applied Biol.*, 18, 494-507.
- SEHGAL (O.P.), 1968. — Purification, properties and structure of maize dwarf mosaic virus. *Phytopathol. Z.*, 62, 232-50.
- SEHGAL (O.P.), JEAN (J.H.), 1970. — Purification of maize dwarf mosaic virus by equilibrium centrifugation in Cesium chloride. *Phytopathology*, 60, 189-90.
- SEHGAL (O.P.), JEAN (J.H.), ZUBER (M.S.), 1968. — Sorghum hybrids as local lesions hosts of maize dwarf mosaic virus. *Phytopathology*, 58, 1708-9.
- SEIN (F.), 1930. — A new mechanical method for artificially transmitting sugar cane mosaic virus. *Proc. Intern. Soc. Sugar Cane Technol.*, 3, 554-63.
- SHEPHERD (R.J.), 1965. — Properties of a mosaic virus of corn and Johnson grass and its relation to the sugar cane mosaic virus. *Phytopathology*, 55, 1250-7.
- SHEPHERD (R.J.), HOLDEMAN (A.L.), 1965. — Seed transmission of the Johnson grass strain of the sugar cane mosaic virus in corn. *Plant Disease Reporter*, 49, 468-9.
- SIGNORET (P.A.), 1970. — Une mosaïque du sorgho dans le Sud de la France, premières observations. *Ann. Phytopathol.*, 2, 681-7.
- SMITH (K.M.), 1957. — A text book of plant virus diseases. Churchill, London, 652 p.
- SNAZELLE (T.E.), BANCROFT (J.B.), ULSTRUP (A.J.), 1971. — Purification and serology of maize dwarf mosaic and sugar cane mosaic viruses. *Phytopathology*, 61, 1059-63.
- SOMMEREYNS (G.), 1967. — Les virus des végétaux. Duculot, Gembloux, 345 p.
- STANIER (R.Y.), DOUDOROFF (M.), ADELBERG (E.A.), 1966. — Microbiologie générale. Masson, Paris, 638 p.
- STOREY (H.M.), 1924. — Diseases of sugar cane of the mosaic type in South Africa. *J. of the Dept. of Agriculture*, 32.
- STOREY (H.M.), 1927. — Strains of the viruses affecting the graminæ. *Proc. Intern. Soc. Sugar Cane Technol.*, 2, 87-8.
- SUMMERS (E.M.), BRANDES (E.W.), RANDS (R.D.), 1948. — Mosaic of sugar cane in the United States, with special reference to strains of the virus. *U.S.D.A. Technical Bull.*, 955, 44-99.
- TAKAHASHI (W.N.), 1951. — Ultraviolet absorption as a measure of TMV nucleoprotein. *Phytopathology*, 41, 142-5.
- TAYLOR (R.H.), PARES (R.D.), 1968. — The relationship between sugar cane mosaic virus and mosaic viruses of maize and Johnson grass in Australia. *Aust. J. Agric. Res.*, 19, 767-73.
- TEAKLE (D.S.), GRYLLIS (N.E.), 1973. — Strains of SCMV infecting cereals and other grasses in Australia. *Aust. J. of Agric.*, 24, 465-77.
- TEAKLE (D.S.), MOORE (R.F.), GEORGE (D.L.), BYTH (D.E.), 1970. — Inheritance of the necrotic and mosaic reactions in sorghum infected with a Johnson grass strain of sugar cane mosaic virus. *Aust. J. Agric. Res.*, 21, 549-56.
- TIPPETT (R.L.), ABBOTT (E.V.), 1968. — A new strain of sugar cane mosaic virus in Louisiana. *Plant Disease Reporter*, 52, 450-1.
- TIPPETT (R.L.), KOIKE (H.), 1970. — Strains of sugar cane mosaic virus in sugar cane varieties effects on stands and yields. *Plant Disease Reporter*, 54, 554-7.
- TODD (E.H.), 1964. — Sugar cane mosaic on St Augustine grass. U.S. Agric. Res. Serv. *Plant Disease Reporter*, 48, 442.
- TOLER (R.W.), 1968. — Maize dwarf mosaic and other currently important diseases of sorghum. *Proc. annual corn and sorghum research Conf. Washington*, 23, 1-11.
- TOSIC (M.), FORD (R.E.), 1972. — Grasses differentiating sugar cane mosaic and maize dwarf viruses. *Phytopathology*, 62, 1466-9.
- TOSIC (M.), FORD (R.E.), 1974. — Physical and serological properties of maize dwarf mosaic and sugar cane mosaic viruses. *Phytopathology*, 64, 312-7.
- TOSIC (M.), FORD (R.E.), MOLINE (H.E.), MEYHEW (D.E.), 1974. — Comparison of techniques for purification of maize dwarf and sugar cane mosaic viruses. *Phytopathology*, 64, 439-42.
- TREMAINE (J.H.), 1970. — Physical, chemical and serological studies on carnation mottle virus. *Virology*, 42, 611-20.
- TU (J.C.), FORD (R.E.), 1968. — Influence of host nutrition on susceptibility of, multiplication in, and symptom expression by corn to infection by maize dwarf mosaic virus. *Phytopathology*, 58, 1343-8.
- TU (J.C.), FORD (R.E.), 1969. — Interaction of maize dwarf mosaic virus strains and sugar cane virus H in corn. *Phytopathology*, 59, 173-8.
- TU (J.C.), FORD (R.E.), 1969. — Effect of temperature on maize dwarf mosaic virus infection, incubation and multiplication in corn. *Phytopathology*, 59, 699-702.
- TU (J.C.), FORD (R.E.), 1969. — Infectivity changes of maize dwarf mosaic virus in vivo and in vitro. *Phytopathology*, 59, 1947-9.
- VAN DER PLANCK (J.E.), 1968. — Disease resistance in plants. Academic Press, N.Y. et Londres, 206 p.
- VAN DER PLANCK (J.E.), 1975. — Principles of plant infection. Academic Press, N.Y. et Londres, 216 p.
- VAN REGENMORTEL (M.H.V.), 1964. — Purification of plant viruses by zone electrophoresis. *Virology*, 23, 495-502.
- VAN REGENMORTEL (M.H.V.), BRANDES (J.), BERCKS (R.), 1962. — Investigations on the properties of watermelon mosaic virus. *Phytopathol. Z.*, 45, 205-16.
- VAN REGENMORTEL (M.H.V.), HENDRY (D.A.), BALTZ (T.), 1972. — A reexamination of the molecular size of cucumber mosaic virus and its coat protein. *Virology*, 49, 647-53.
- VARMA (A.), GIBBS (A.J.), WOODS (R.D.), FINCH (J.T.), 1968. — Some observations on the structure of the filamentous particles of several plant viruses. *J. Gen. Virol.*, 2, 107-14.
- VON WECHMAR (B.), HAHN (H.S.), 1967. — Virus diseases of cereals in South Africa. II. Identification of two elongated plant viruses as strains of sugar cane mosaic virus. *S. Afr. J. Agric. Sci.*, 10, 241-53.
- VUITTENEZ (A.), 1971. — Serological methods for diagnosis of viruses in grapevines and other woody perennials (7th Conf. of the Czechoslovak Plant Virologists). *Plant Virology*, 1973, 479-83.
- WAGNER (G.W.), DALE (J.L.), 1966. — A serological comparison of maize dwarf mosaic virus isolates. *Phytopathology*, 56, 1422-3.
- WEBER (K.), OSBORN (M.), 1969. — The reliability of molecular weight determinations by Dodecylsulfate-Polyacrylamide gel electrophoresis. *The J. of Biochem. Chem.*, 241, 4406-12.
- WILLIAMS (L.E.), ALEXANDER (L.J.), 1964. — An unidentified virus isolated from corn in Southern Ohio. *Phytopathology*, 54, 912.
- WURTZ (M.), 1969. — Propriétés d'un mutant thermorésistant du virus de la Mosaïque du tabac. Thèse 3^e cycle, Strasbourg, 41 p.