

Influence du pH sur le Virus du Clump ⁽¹⁾ de l'Arachide (Peanut Clump Virus) et nouvelle méthode rapide de purification

J.-C. THOUVENEL, C. FAUQUET et M. DOLLET *

Laboratoire de Virologie, Station ORSTOM d'Adiopodoumé,
BP V 51, Abidjan, Côte-d'Ivoire.

* (IRHO) Station de Recherche de Pathologie Comparée, I.N.R.A.-C.N.R.S.,
30380 St-Christol-lès-Alès.

Résumé

Le point iso-électrique du Virus du Clump de l'Arachide (Peanut Clump Virus) a été déterminé. La stabilité du virus à différents pH a été étudiée d'après la variation du pouvoir infectieux. Ces données ont permis de mettre au point une méthode rapide de purification du virus après une clarification par acidification.

Introduction

L'agent causal du Clump de l'Arachide a été identifié comme étant un virus en bâtonnet à deux composants (Thouvenel *et al.*, 1974). Une méthode de purification par précipitation au PEG après clarification au butanol-chloroforme a été mise au point malgré des difficultés dues à l'agrégation du virus (Thouvenel *et al.*, 1976). Le présent article, conçu à partir des résultats de mesure du point iso-électrique du virus, explique en partie ces phénomènes d'agrégation. L'étude de l'influence du pH sur l'infectivité des particules virales a permis en outre de mettre au point une méthode rapide de purification du virus en clarifiant le broyat de plantes malades par acidification.

Matériel et méthodes

Le virus est multiplié sur *Chenopodium amaranticolor* en serre vitrée à une température moyenne de 30 à 35 °C. Pour l'étude de la stabilité en fonction du pH et la détermination du point iso-électrique, le virus est purifié selon la méthode décrite précédemment (Thouvenel *et al.*, 1976).

Le pouvoir infectieux est éprouvé par inoculation sur *C. amaranticolor* et sur *Arachis hypogaea* après saupoudrage des feuilles avec du carborundum. Le chénopode réagit localement à l'inoculation, mais de manière semi-systémique (Thouvenel *et al.*,

(¹) Le nom de « Clump », déjà couramment utilisé en Français depuis 1931 pour désigner cette maladie, a été conservé pour éviter la confusion avec le Virus du Rabougrissement de l'Arachide (Peanut Stunt Virus).

27 OCT. 1978

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

88 Collection de Référence
M no 4376 P. 2, A.

1976). Les lésions chlorotiques difficilement visibles se rejoignent et envahissent toute la feuille, devenant de plus en plus apparentes avec le temps. Pour cette raison, seuls le temps nécessaire à l'apparition d'un symptôme et le nombre de feuilles qui réagissent sont notés.

Le point iso-électrique du virus a été déterminé par électro-focalisation sur une colonne LKB de 110 ml, avec un gradient d'ampholytes de pH 3,5 à pH 10. Pour chaque expérience une charge de 2 à 3 mg de virus dans de l'eau bidistillée a été déposée sur la colonne. La colonne est maintenue sous une tension de 300 V jusqu'à stabilisation de l'intensité du courant à un minimum pendant 24 h (soit environ 72 h au total). Le gradient est récolté par le bas en cent dix fractions de 1 ml, et la densité optique à une longueur d'onde de 280 nm enregistrée à la sortie de la colonne au moyen d'un Uvicord II LKB muni d'une cellule à flot continu de 0,1 ml. Le pH de chaque fraction est mesuré au moyen d'un pH mètre Tacussel Isis 4 000. La superposition des deux courbes indique le point iso-électrique du virus.

Pour l'étude de la stabilité du virus en fonction du pH, nous avons repris la méthode utilisée par Haviarova et Valenta en 1972 dans l'étude du « Red Clover Mottle Virus ». Les tampons, utilisés à la molarité de 0,025 M, sont les suivants :

- pH 1, pH 2 : Acide chlorhydrique — Chlorure de potassium.
- pH 3 à pH 5 : Tampon citrate.
- pH 6 à pH 8 : Tampon phosphate.
- pH 9 : Tampon borate.
- pH 10 et pH 11 : Tampon borax — Soude.

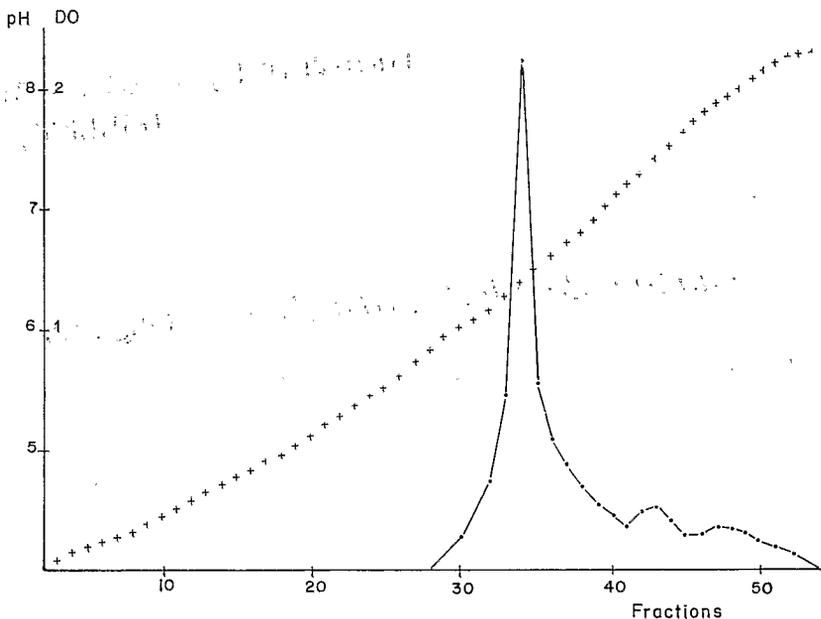


FIG. 1. — *Electro-focalisation sur gradient d'ampholytes pH 3,5 à pH 10.*

Electro-focusing on gradient of ampholytes pH 3.5 to pH 10.

— : Densité optique à 280 nm (Optical density at 280 nm).

+++ : Mesure du pH fraction par fraction (Measure of pH value of each fraction).

1 ml de virus purifié (0,1 UDO) dans du tampon borate de sodium 0,05 M, pH 8, contenant 0,001 M d'EDTA, est dialysé pendant 24 h à 6 °C, contre 300 ml de tampon à pH désiré (le tampon est renouvelé deux fois) ; puis le virus est dialysé à nouveau pendant 24 h contre du tampon borate de sodium 0,025 M, pH 8, dans les mêmes conditions. Pour chaque valeur de pH, le virus est ensuite dilué à 10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3} et 10^{-4} , et chaque dilution est inoculée sur cinq feuilles de quatre plants de *C. amaranticolor*.

Les spectres d'absorption du virus purifié sont réalisés au moyen d'un spectrophotomètre Zeiss PMQ II.

Résultats

1. — Détermination du point iso-électrique

Le virus précipite sous forme d'un anneau visible dans le gradient d'ampholyte. Le point iso-électrique du Virus du Clump de l'Arachide est de $6,45 \pm 0,10$ (fig. 1).

L'inoculation du virus récupéré à la sortie de la colonne à *C. amaranticolor* et *A. hypogea* montre que celui-ci était infectieux.

2. — Stabilité en fonction du pH

Le virus conserve la majorité de son pouvoir infectieux après 24 h à pH 5, pH 6, pH 7 et pH 8, avec un maximum de stabilité à pH 6. Il perd tout pouvoir infectieux après 24 h en dessous de pH 3 et au-dessus de pH 10 (tabl. 1, fig. 2).

TABLEAU 1

Infectivité du Virus du Clump de l'Arachide maintenu 24 h à différents pH. Le résultat donné est celui du 11^e j après inoculation. Il est mesuré par le nombre de feuilles avec symptômes sur 20 feuilles de C. amaranticolor inoculées

Infectivity of the Peanut Clump Virus maintained 24 h at different pH values. The results of the eleventh day after inoculation are given. They are measured by the number of infected leaves on 20 leaves inoculated

| pH | Non dilué | Dilution de l'inoculum | | | |
|----|-----------|------------------------|-----------|-----------|-----------|
| | | 10^{-1} | 10^{-2} | 10^{-3} | 10^{-4} |
| 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 2 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 3 | 20 | 15 | 1 | 0 | 0 |
| 4 | 20 | 20 | 5 | 0 | 0 |
| 5 | 20 | 20 | 8 | 3 | 0 |
| 6 | 20 | 20 | 18 | 4 | 7 |
| 7 | 20 | 20 | 11 | 1 | 0 |
| 8 | 20 | 20 | 14 | 1 | 0 |
| 9 | 15 | 16 | 9 | 0 | 0 |
| 11 | 1 | 1 | 0 | 0 | 0 |
| 11 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |

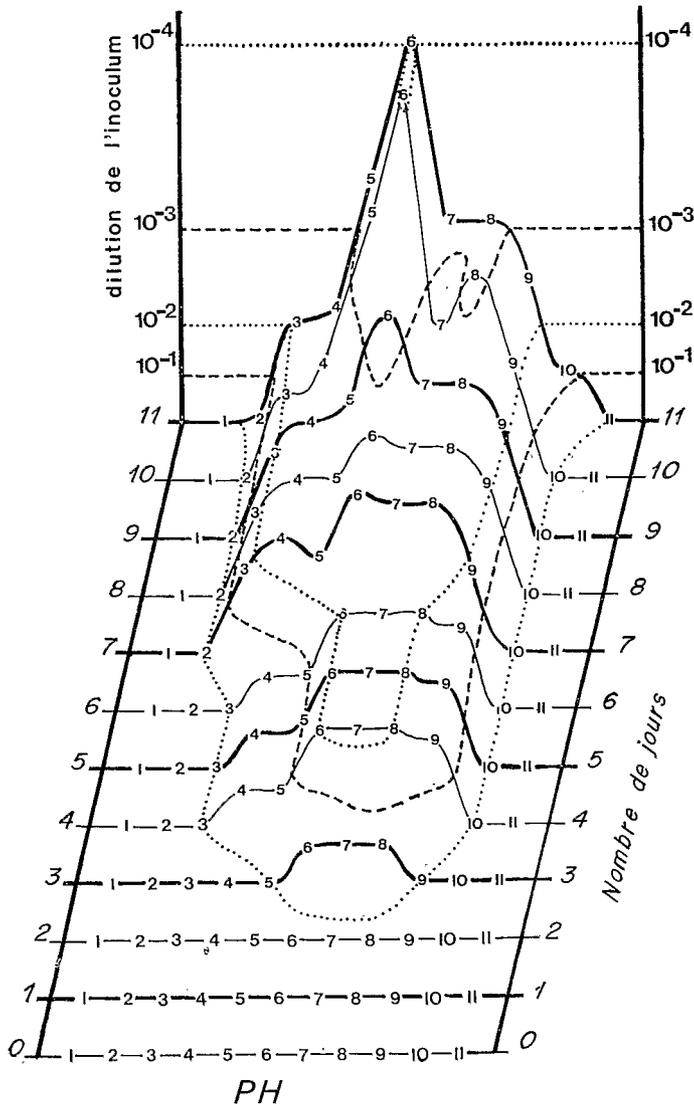


FIG. 2. — Etude de la stabilité du Virus du Clump de l'Arachide. La variation du pouvoir infectieux est rapportée au temps d'apparition des symptômes sur les plantes-tests, inoculées avec une gamme de dilution de chaque échantillon maintenu 24 h au pH déterminé. En abscisse de gauche à droite : valeurs du pH. En abscisse de bas en haut : date d'apparition des symptômes sur les plantes inoculées. En ordonnée : dilution de l'inoculum.

Study of the stability of the Peanut Clump Virus according to the pH. The evolution of the infectivity of each virus batch, maintained during 24 hours at a given pH value, is measured daily with the reaction of test plants, inoculated with successive dilution of each batch.

3. — Méthode de purification

La conservation du pouvoir infectieux du virus, malgré l'exposition à des pH faibles, nous a conduit à éprouver l'acidification en tant que méthode de clarification. Ceci nous a permis de mettre au point une méthode rapide de purification.

Les feuilles de *C. amaranticolor* congelées sont broyées pendant 2 min au Waring-Blendor en présence de tampon borate de potassium 0,2 M, pH 8,2, contenant de l'urée 1 M, de l'EDTA 0,01 M et du mercapto-éthanol 0,5 p. 100 (2 ml de tampon/g). Après passage sur étamine, le filtrat (pH 8 environ) est acidifié à pH 4,2 à l'aide d'acide citrique 2 M, et conservé 30 min dans de la glace. A l'aide de potasse 6 N, le pH est remonté à 8,2 ; le broyat est alors centrifugé 10 min à 10 000 g. Le pH du surnageant, après adjonction de 4 p. 100 de chlorure de sodium, est amené à 6,4 (point iso-électrique du virus), et 5 p. 100 de PEG 20 000 sont ajoutés et dissous.

La préparation est maintenue 1 h à 4 °C, puis centrifugée 15 min à 16 000 g et le surnageant est éliminé. Les culots sont remis en suspension dans le tampon de broyage, dilué dix fois (dans environ 1/10^e du volume initial). Après une centrifugation de 12 min à 10 000 g, cette suspension est ultracentrifugée pendant 2 h à 78 000 g. Les culots sont dispersés dans 2 ml de tampon borate de potassium 0,05 M, pH 8,2, et laissés en repos 1 h.

Après une centrifugation de 10 min à 10 000 g, les 2 ml de suspension sont mélangés à 2 ml d'une solution à 80 g/100 ml de chlorure de césium dans un tube de rotor SW 50.

Après 14 h à 115 000 g, une bande opalescente de virus purifié est visible dans le tiers inférieur du tube. Cette bande est collectée à la pipette et le virus est reconcentré par ultra-centrifugation, après dilution ou dialyse.

Le spectre d'absorption en UV du virus purifié montre un maximum à 267 nm et un minimum à 250 nm. Le rapport DO_{260}/DO_{280} est de 1,09 ; et le rapport DO_{267}/DO_{250} est de 1,08. Ces valeurs sont caractéristiques du Virus du Clump de l'Arachide.

Le rendement est de l'ordre de 15 à 20 mg/kg de feuilles.

L'inoculation d'une série de dilutions de la suspension de virus purifié à des *C. amaranticolor* et à des arachides montre que celui-ci est aussi infectieux que le virus préparé par la méthode au butanol-chloroforme. Une suspension contenant 0,02 mg/ml de virus purifié est infectieuse jusqu'à une dilution de 10⁻⁴.

Conclusion

La détermination du point iso-électrique du Virus du Clump de l'Arachide, qui s'est révélé très proche de la neutralité (pHi = 6,45), permet de comprendre les difficultés rencontrées lors des premiers essais de purification (Thouvenel *et al.*, 1976). Les tampons de broyage utilisés avaient un pH de 8 que le broyage du matériel abaissait et amenait près du point iso-électrique du virus. Comme le virus précipite dès qu'il est placé à un pH proche de son point iso-électrique, les centrifugations à faible vitesse (environ 5 000 g) avaient entraîné sa sédimentation.

Nous n'avons pas pris en compte, dans l'étude de la stabilité du virus en fonction du pH, les différences de forces ioniques entraînées par la variété des tampons utilisés ; il est cependant probable que celles-ci seraient à considérer pour une étude plus précise. Toutefois, cette première approche, jointe à la connaissance du point iso-électrique, a permis d'utiliser l'acidification comme méthode de clarification. Porter l'extrait à pH 4,2 pendant un temps court (30 min) ne produit qu'une perte

négligeable de virus, mais suffit à dénaturer les protéines de la plante. Le pH doit alors être remonté au-dessus de 8 avant d'éliminer les protéines dénaturées car, à ce pH, le virus ne sédimente pas lors d'une centrifugation à basse vitesse. Par contre, lors de la précipitation par le PEG, il est intéressant d'amener le pH aux environs du point iso-électrique, ce qui permet de précipiter tout le virus en très peu de temps. Cette méthode de purification donne de meilleurs rendements (15 à 20 mg/kg de feuilles) que la méthode au butanol-chloroforme ; le virus est aussi infectieux, et elle est réalisable en moins de 24 h avec un minimum d'opérations.

Les phénomènes d'agrégation constituent une des difficultés majeures dans la purification de certains virus en bâtonnet à plusieurs composants déjà décrits comme le « *Nicotiana Velutina Mosaic Virus* » (Randles *et al.*, 1976) et le « *Beet Necrotic Yellow Vein Virus* » (Tamada et Baba, 1973 ; Putz, 1977). Dans ce dernier cas, le virus n'est pas sédimenté par 15 min à 5 000 g si le pH est supérieur ou égal à 7. En dessous de pH 7, le virus se retrouve en partie dans le culot, et à pH 5 tout le virus est sédimenté. Il est d'autre part bien établi que la force ionique et le pH sont déterminants sur l'état d'agrégation de la protéine native des virus en bâtonnet comme le Virus de la Mosaïque du Tabac, le Virus du Rattle du Tabac, et le Barley Stripe Mosaic Virus (Fritsch *et al.*, 1973 ; Atabekov *et al.*, 1968 ; Hirth, 1976). Il serait intéressant de rechercher si les phénomènes d'agrégation, observés lors des purifications des virus en bâtonnet à plusieurs composants, ne sont pas dus aux pH utilisés, si, comme nous l'avons montré pour le Virus du Clump de l'Arachide, le pHi est proche de la neutralité.

Reçu pour publication en février 1978.

Remerciements

Les auteurs remercient leur directeur scientifique, le Professeur L. Hirth, pour ses conseils dans la réalisation de ce travail, et pour la correction du manuscrit.

Summary

Effect of pH on Peanut Clump Virus, and a rapid method of purification

The iso-electric point of Peanut Clump Virus (PCV) is determined. Stability of PCV at different pH values is studied by variation of infectivity. According to these results, a new rapid method of purification is described, using clarification by acidification.

Références bibliographiques

- ATABEKOV J. G., NOVIKOV V. K., KISELEV N. A., KAFTANOVA A. S., EGOROV A. M., 1968. Stable intermediate aggregates formed by the polymerization of Barley Stripe Mosaic Virus protein. *Virology*, **36**, 620-638.
- FRITSCH C., WITZ J., ABOU HAIDAR M., HIRTH L., 1973. Polymerization of Tobacco Rattle Virus protein. *Febs Lett.*, **29**, 211-214.
- HAVIAROVA S., VALENTA V., 1972. pH stability of Red Clover Mottle Virus. *Acta virol.*, **16**, 360.

- HIRTH L., 1976. Reconstitution of helical viruses other than TMV. In FRAENKEL-CONRAT H., WAGNER R. R., *Comprehensive Virology*, **6**, 39-63, Plenum Press, New-York, London.
- PUTZ C., 1977. Composition and structure of Beet Necrotic Yellow Vein Virus. *J. gen. Virol.*, **35**, 397-401.
- RANDLES J. W., HARRISON B. D., ROBERTS I. M., 1976. Nicotiana Velutina Mosaic Virus : purification, properties and affinities with other rod-shaped viruses. *Ann. appl. Biol.*, **84**, 193-204.
- TAMADA T., BABA T., 1973. Beet Necrotic Yellow Vein Virus from Rizomania-affected sugar Beet in Japan. *Ann. phytopathol. Soc. Jpn*, **39**, 325-332.
- THOUVENEL J.-C., DOLLET M., FAUQUET C., 1976. Some properties of Peanut Clump, a newly discovered virus. *Ann. appl. Biol.*, **84**, 311-320.
- THOUVENEL J.-C., GERMANI G., PFEIFFER P., 1974. Preuve de l'origine virale du Rabougrissement ou Clump de l'Arachide en Haute-Volta et au Sénégal. *C. R. Acad. Sci., Paris, sér. D*, **278**, 2847-2849.
-