

DIPLOME D'ETUDES SUPERIEURES
DE SCIENCES NATURELLES

XXXXXXXXXXXXXXXXXXXX

INTERFERENCE ENTRE TROIS SOUCHES DU VIRUS
DE LA MOSAÏQUE DU TABAC

par

Jean DUBERN

15 novembre 1967

Université Louis Pasteur - Faculté des Sciences de Strasbourg

DIPLOME D'ETUDES SUPERIEURES

Premier sujet : INTERFERENCE ENTRE TROIS SOUCHES DU VIRUS DE LA
MOSAIQUE DU TABAC.

Deuxième sujet : Les principales maladies à virus, bactéries et
champignons, des principales cultures de la Côte d'Ivoire.

Soutenu le 15 novembre 1967 devant la Commission d'examen

M. HIRTH : Président
M. DURANTON : examinateur
M. LACROUTE : examinateur.

DUBERN Jean

Novembre 67

TABLE DES MATIERES

	page
- Introduction.	I
- Matériel et méthode:	3
1° - souches de virus;	3
2° - plantes hôtes;	4
3° - technique de production des virus;	4
4° - technique de purification des virus.	6
5° - évaluation de l'interférence.	10
- Résultats:	15
1° - vérification des propriétés des trois souches de virus;	15
2° - évaluation des concentrations virales dans les feuilles, après la 1 ^{ère} inoculation;	17
3° - action de la température sur la taille des lésions;	19
4° - étude des potentiels d'interférence des trois souches de virus;	21
5° - analyse statistique.	23
- Discussion:	33
1° - Nature des inhibiteurs responsables de l'interférence virales dans les plantes;	33
2° - Interprétation des résultats.	35
- Conclusion.	38
- Annexe.	39

INTERFERENCE ENTRE TROIS SOUCHES
DU VIRUS DE LA MOSAÏQUE DU TABAC

INTRODUCTION

La résistance acquise à un virus des plantes, encore appelée immunité, a été démontrée par Price, en 1935, sur *Zinnia elegans* infecté par le Virus de la Mosaïque du Concombre, et confirmée, en 1951, par Bennett avec plusieurs virus de la Pomme de terre.

Il a été ensuite démontré que l'infection d'une partie de plante peut induire la résistance à une infection ultérieure, dans une autre partie de cette même plante (Gilpatrick et Weintraub, 1952); quand les feuilles les plus basses d'un Oeillet (*Dianthus barbatus*) sont inoculées avec une souche nécrotique du Virus de la Mosaïque de l'Oeillet, les feuilles apicales deviennent résistantes à cette souche.

Par la suite, Yarwood (1953) et Ross (1959; 1961a) étudient la résistance localisée, induite par le Virus de la Mosaïque du Tabac, chez des plantes hypersensibles (Haricot et Tabac).

L'hypothèse possible d'une inhibition compétitive et de la prémunition semble écartée par suite de l'absence de virus dans la partie résistante (Weintraub et Kemp, 1961).

L'immunité, résultat de l'interaction entre un virus et sa plante-hôte, peut être conférée par des virus (Virus de la Nécrose du Tabac) différents de ceux contre lesquels elle serait utilisée (Virus de la Mosaïque du Tabac) (Loebenstein et Ross, 1963). L'interaction apparente entre les deux virus est appelée interférence (il s'agit en fait d'une interaction du type virus-plante-virus).

L'immunité ainsi conférée n'est pas totale, et sa non-spécificité vis à vis des virus, sujet très controversé par les auteurs, ne semble pas

non plus absolue. En effet, la résistance induite par la présence du virus de la Mosaïque du Tabac (V M T) dans une plante-hôte appropriée, est manifestée non seulement contre le V M T mais aussi contre le Virus de la Nécrose du Tabac, celui de la Mosaïque du Navet et ceux du "Ringspot" du Tabac et de la Tomate. La résistance n'est toutefois pas aussi grande contre ces virus qu'elle l'est contre le V M T, mais chacune de ces souches induit une résistance analogue à celle induite par le VMT. (Ross, 1961b).

En 1963, Ruiz-Gomez et Isaacs ont montré, dans une étude effectuée sur onze virus différents d'animaux, que la sensibilité de chacun à l'interféron, substance inhibitrice induite par les virus, est maximale lorsque celui-ci se développe à sa température optimale et que la production d'interféron provoquée par le virus est d'autant moins grande que celui-ci possède une température de développement élevée.

Possédant au laboratoire trois souches de V M T, qui diffèrent par leur thermosensibilité, nous nous sommes demandés si elles pourraient aussi se caractériser par des capacités différentes d'induire des substances inhibitrices et leur sensibilité à ces substances.

MATERIEL ET METHODES

I° - souches de virus.

souche VMTc :

Cette souche est la souche dite "commune" du VMT, conservée par passages successifs sur des Tabacs (*Nicotiana tabacum* L., var. White Burley). Elle est très stable et est transmise uniquement par voie mécanique (ou par greffe) (Limasset et Darpoux, 1951).

Son inoculation à des Tabacs provoque une déformation très nette des jeunes feuilles et ^{un} nanisme accentué se traduisant par une diminution de la hauteur des entre-nœuds et un développement plus faible des feuilles (Pavillard, 1953; Hirth, 1958). Des Tabacs (*N. tabacum* L., var. Judy Pride), âgés de deux mois, et placés à 24°C et 80% d'humidité en serre stérile, présentent les symptômes classiques de la Mosaïque: déformation foliaire et nanisme; les premiers symptômes apparaissent généralement 6 à 7 jours après l'inoculation. 24°C est la température optimale de multiplication du virus. A 36°C, aucun symptôme de mosaïque n'apparaît (Lebourier et Hirth, 1966).

souche TC :

Il s'agit d'une souche thermophile du VMT (Lebourier et Hirth, 1966). Des Tabacs (*N. tabacum* L., var. Judy Pride), inoculés et laissés à 24°C, ne montrent l'apparition d'aucun symptôme: ni déformation des jeunes feuilles, ni arrêt de la croissance des plantes. A 36°C, une mosaïque nette apparaît sans être toutefois accompagnée de déformation foliaire. La température optimale de multiplication se situe entre 32°C et 36°C.

souche MF₂-:

Cette souche thermosensible a aussi été isolée par Lebeurier et Hirth (1966). Elle induit la formation de symptômes très doux: pas d'arrêt de croissance et seulement de légères déformations sur les jeunes feuilles. Cette souche se développe d'une manière optimale sur un très large intervalle de température : de 16°C à 32°C.

2° - plantes hôtes.

Les trois souches de VMT sont multipliées sur des plantes répondant à l'inoculation par une infection généralisée (systémique); il s'agit de *Nicotiana tabacum* L. dans tous les cas, mais de variétés diverses: Judy Pride, White Burley ou Samsun.

Le pouvoir pathogène est évalué à l'aide de plantes hypersensibles répondant à l'inoculation par des lésions nécrotiques et possédant le gène N des Tabacs *Nicotiana glutinosa* L. (Holmes, 1930). Des Tabacs, *N. tabacum* L., var. Samsun NN, sont utilisés pour toutes les expériences (Ross, 1961b). Ces plantes croissent en serre stérile à température de 26°C (\pm 2°C) et maintenue à un degré hygrométrique de 80%. Un appoint d'éclairage leur est fourni en hiver. Elles sont semées en serre stérile, repiquées au bout de trois semaines et mises en pots de 17 à 19 cm, à l'âge de six semaines, puis utilisées à l'âge de 10 à 15 semaines; elles ont alors 7 à 9 feuilles de 8 à 15 cm de longueur.

3° - technique de production des virus.

Cette technique est celle qui a été mise au point par Lebeurier et Hirth (1966). Les trois souches de VMT sont multipliées sur des disques découpés dans des feuilles de *Nicotiana tabacum* L., var. Judy Pride. Ces disques sont mis en survie en milieu minéral de Knop dilué au tiers de sa concentration, dans des fioles à toxine placées dans des bacs thermostatés à 18°C pour la souche MF₂, à 24°C pour la souche VMTc et à 36°C pour la souche TC, de sorte que chacune des souches se multiplie à

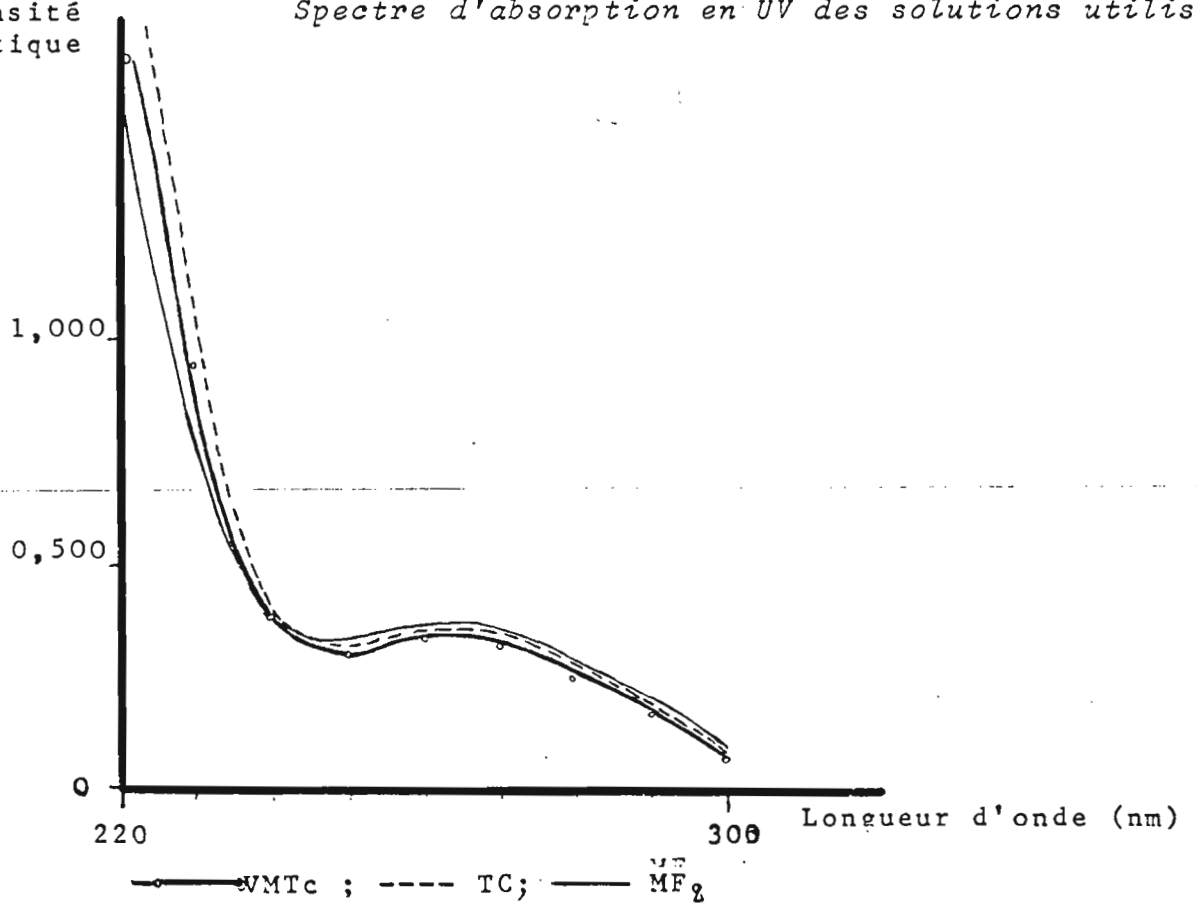
TABLEAU A : *Caractères des solutions-mères utilisées*

Souche	Longueur d'onde *			Concentrations des solutions en µg/ml
	260	280	260/280	
VMTc	648	542	1,195	201
TC	655	552	1,186	203
MF ₂	668	560	1,193	207

* Les longueurs d'onde utilisées sont exprimées en nm ($= 10^{-9}$ m). Le rapport 260/280 exprime la quantité relative de protéines virales et de nucléoprotéines ; un rapport égal à 1,2 correspond à une préparation riche en nucléoprotéines.

Densité optique

Spectre d'absorption en UV des solutions utilisées.



sa température optimale.

Les disques sont inoculés en frottant doucement leur surface à l'aide d'une spatule en verre, après dépôt d'une goutte (0,1 ml) de suspension de virus à 200 µg/ml et de célite (hyflosupersel - 50 mg/ml). Ils sont récoltés au bout de 5 jours (36°C) ou de 10 jours (18° et 24°C) et congelés à -15°C.

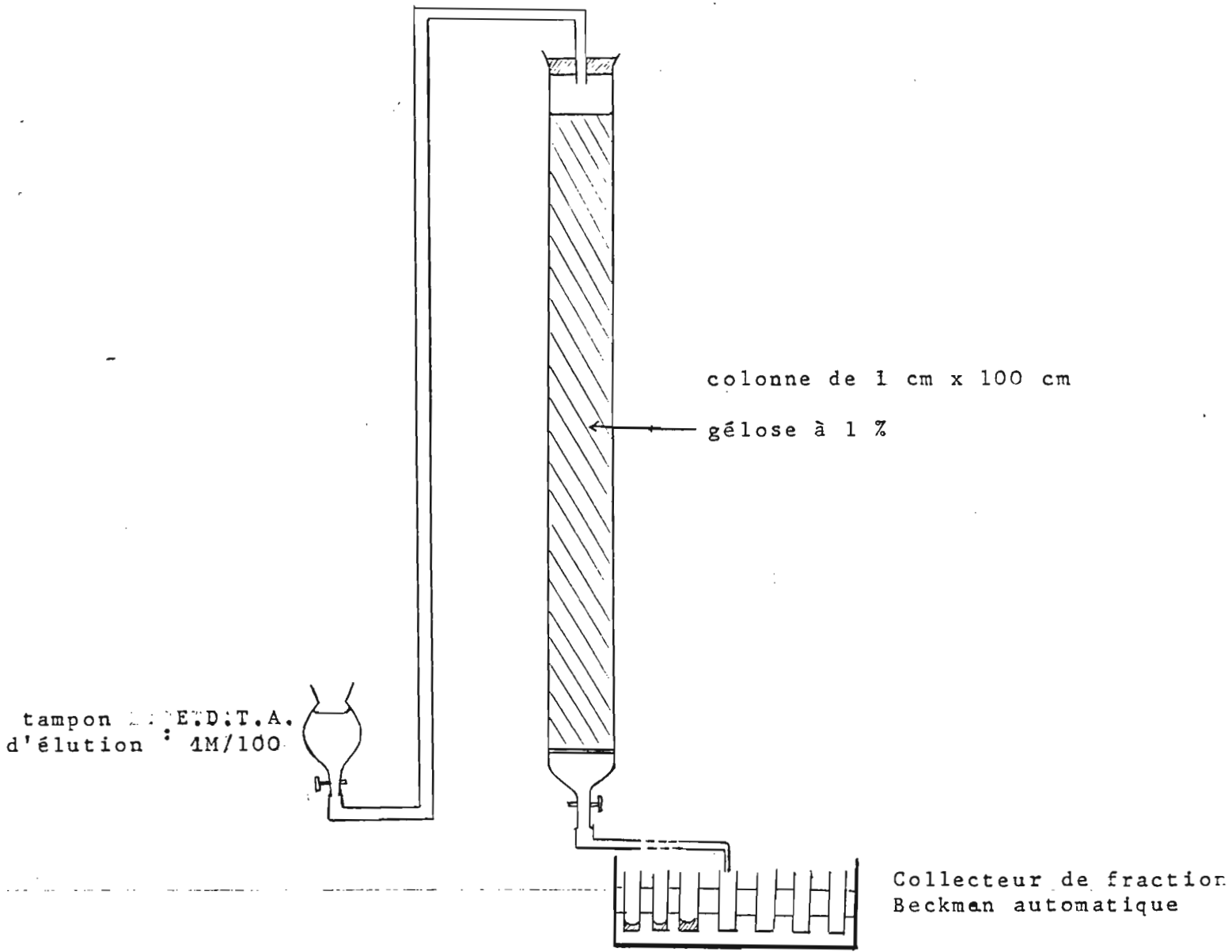
4° - technique de purification du virus.

Les disques congelés sont broyés au mortier en présence de sable de Fontainebleau stérile et de tampon phosphate (0,01M); ClNa (0,9%) pH= 7. Le broyat est centrifugé à 1300 g pendant 10 minutes (centrifugeuse Jouan); le culot est éliminé et le surnageant est centrifugé 40 minutes à 20 000g (centrifugeuse Servall). Le culot est éliminé et le surnageant est ultracentrifugé à 105 000 g pendant 2 heures (ultracentrifugeuse Spinco Modèle L 2, et Rotor 50 Titane). Le culot est ensuite repris dans du tampon phosphate- E.D.T.A. 0,01 M; pH = 7,0, dans le but de détruire les ribosomes 70S et d'éviter l'adsorption de protéines et de nucléo-protéines normales de plante sur les virions (Ginosa et al., 1954).

Le cycle de centrifugation (Jouan) et d'ultracentrifugation (Spinco) est repris trois fois. Puis le dernier culot est remis en suspension dans de l'eau bidistillée et dialysé 24 heures contre de l'eau. Le culot final est repris dans du tampon phosphate-ClNa, pH = 7. Les suspensions sont conservées au congélateur à -20°C.

Avant utilisation, les suspensions sont centrifugées dans un gradient de chlorure de césium (densité initiale = 1,31) afin d'éliminer les protéines normales de la plante et les capsides; puis sont dialysées contre de l'eau. En effet, le gradient de $CsCl_2$ est un gradient de densité; les particules légères (protéines normales et capsides) sont séparées des particules lourdes (VMT).

Le rapport des densités optiques lues au spectrophotomètre (TABLEAU A) à 260 nm et 280 nm est alors de 1,20 pour chacune des trois suspensions. Les absorptions de lumière de ces longueurs d'onde sont



Montage de la colonne

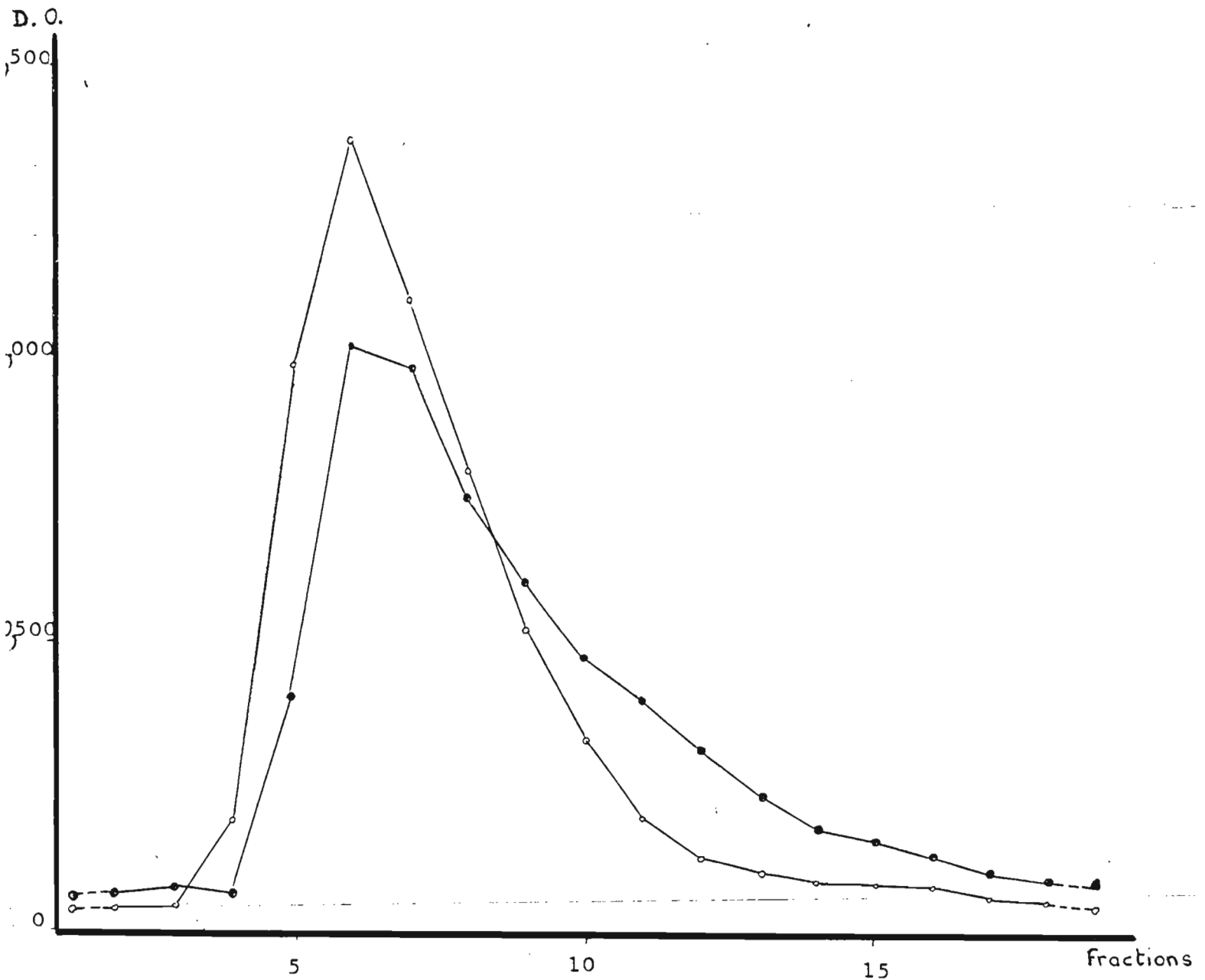
fonction de la quantité relative de protéine (maximum d'absorption à 280 nm) et d'acide nucléique (maximum d'absorption à 260 nm) dans le virion. Le rapport de ces deux densités est donc constant pour un virus donné (1,20 pour le VMT). Les suspensions ne contiennent donc que des virus complets. En multipliant la densité optique lue à 260 nm par le coefficient d'extinction caractéristique du VMT (0,31) et par 1 000, on obtient la concentration en $\mu\text{g}/\text{ml}$.

Afin d'obtenir des suspensions virales contenant le plus possible de particules infectieuses (300 nm de longueur), les solutions recueillies après passage sur gradient de chlorure de césium sont centrifugées à 26 000 tours par minute pendant 25 minutes (Ultracentrifugeuse Spinco Modèle L2, Rotor 40). Les surnageants contenant des particules incomplètes sont éliminés. Les culots sont repris dans le tampon phosphate (0,01 M)-NaCl (0,9%), pH=7,0. Ce tampon a été choisi en accord avec les travaux montrant l'accroissement du pouvoir infectieux du virus en présence de K_2HPO_4 et de Na_2HPO_4 (Stanley, 1935; Thornberry, 1935; Yarwood, 1952).

On vérifie que les solutions ont effectivement été enrichies en grandes particules (300 nm), donc en particules infectieuses, en effectuant une chromatographie sur colonne de gélose, suivant la technique de Steere (1963). Une colonne de 1 cm de diamètre sur 100 cm de hauteur est remplie de gélose Agar Difco à 1% en E.D.T.A. 0,01 M, calibrée en particules sphériques de 40 à 60 mesh. Le débit de la colonne est alors de 4 à 6 ml à l'heure. L'ampoule contenant le tampon d'élu-tion est fixée en bas de la colonne afin d'obtenir une légère dépression sur la colonne et afin d'éviter le tassement des particules de gélose. Le tampon d'élu-tion utilisé est de l'E.D.T.A. 0,01 M, celui-ci ayant pour avantage d'éviter l'agrégation des particules virales.

La courbe obtenue par lecture spectrophotométrique des sus-pensions de VMTc concentré par ultracentrifugation lente (fig. I) montre un pic plus élevé et étroit que celui correspondant au VMTc n'ayant subi qu'une seule purification, ce qui indique que l'on est en présence d'une population plus homogène.

Figure 1 : Densités optiques des fractions recueillies après chromatographie sur colonne de gélose 1 %.



La courbe obtenue par lecture spectrophotométrique des suspensions de VMTc, concentré par ultracentrifugation lente, montre un pic plus élevé et étroit que celui correspondant au VMTc n'ayant subi qu'une simple purification, ce qui indique que l'on est en présence d'une population plus homogène.

- — ○ VMTc concentré par Spinco à 26.000 t/mn
- — ● VMTc extraction normale

5° - évaluation de l'interférence.

La méthode employée s'inspire de celle qui a été mise au point par Ross (1961b). Deux possibilités nous sont offertes pour mesurer nos résultats: compter le nombre des lésions ou évaluer leur taille. Nous avons choisi la seconde solution, tenant compte des travaux de Ross (1965): "L'effet attendu sur la taille des lésions est souvent beaucoup plus important et plus reproductible que celui sur le nombre, et un effet sur la taille apparaît souvent plus tôt et sans aucune conséquence sur le nombre des lésions".

Les jeunes plants de Tabac (*N. tabacum* L., var. Samsun NN), âgés de 2 à 3 mois, sont entreposés dans une salle à température relativement constante (20° à 24°C) et de taux d'humidité assez faible (60 à 80 %); elles sont étêtées 2 jours avant la première inoculation, de façon à accroître leur sensibilité par une croissance rapide, ce qui peut encore être augmenté par une mise à l'obscurité pendant les dernières 24 heures; trois feuilles de tailles aussi semblables que possible sont laissées sur chaque plante. Les demi-feuilles gauches sont inoculées, en premier, avec une solution de virus hautement infectieux à 2 µg/ml, après avoir été saupoudrées avec de la célite. Quelques jours plus tard (3 à 15, selon l'expérience), les demi-feuilles droites sont inoculées avec une solution virale à 0,05 µg/ml.

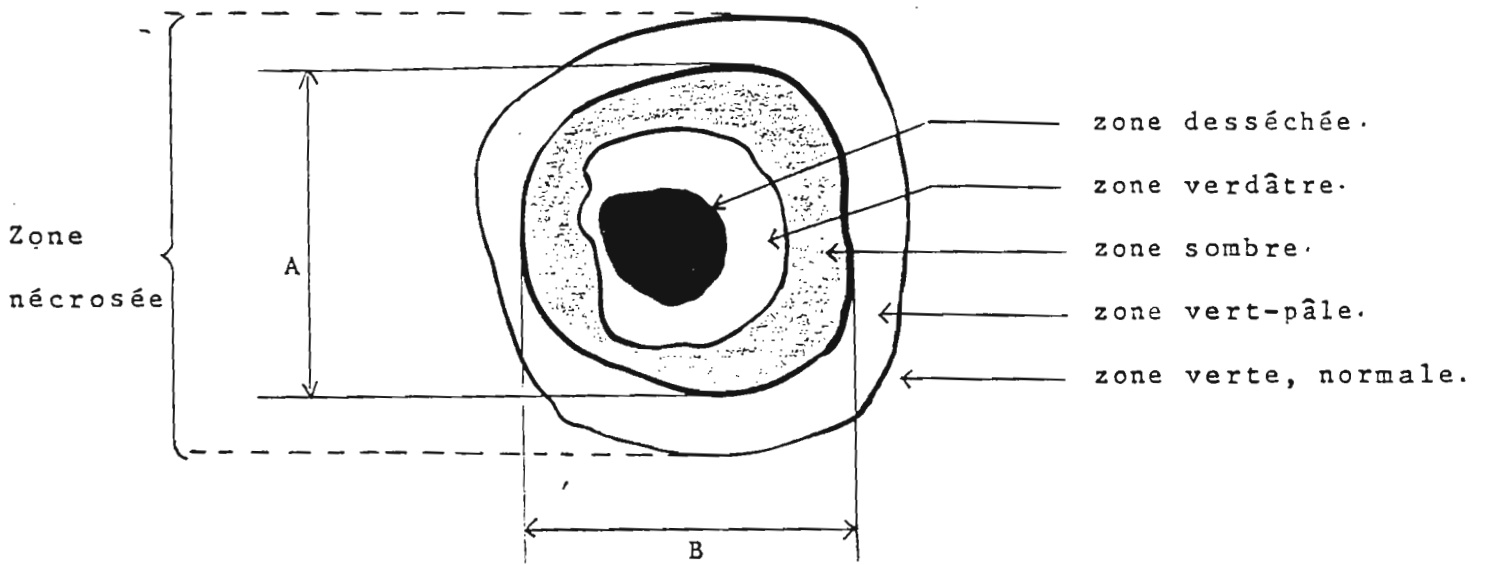
Il faut noter que les trois demi-feuilles gauches de chaque plante sont toujours infectées (première inoculation) avec la même souche de virus, alors que les trois demi-feuilles droites sont infectées (deuxième inoculation) avec trois souches différentes. Ainsi, chaque virus de la seconde inoculation répond à l'inhibition induite par un seul virus (on admettant, ce qui est vraisemblable, qu'il n'y ait pas interaction des virus de la deuxième inoculation). Le cas inverse ne peut se concevoir car les substances inhibitrices induites diffuseraient alors dans toute la plante; l'inhibition du développement du virus de la seconde inoculation serait due à l'action simultanée des substances induites par les trois souches.

TABLEAU B : Schéma des inoculations réalisées
pour évaluer l'interférence virale.

plante n°	I à 3		4 à 6		7 à 9		10 à 12	
demi-feuille	(I ^e -inoc.) gauche	(2 ^e -inoc.) droite	(I ^e -inoc.) gauche	(2 ^e -inoc.) droite	(I ^e -inoc.) gauche	(2 ^e -inoc.) droite	(I ^e -inoc.) gauche	(2 ^e -inoc.) droite
1 ^{ère} feuille	tampon	VMTc	VMTc	VMTc	TC	VMTc	MF ₂	VMTc
2 ^{ème} feuille	tampon	TC	VMTc	TC	TC	TC	MF ₂	TC
3 ^{ème} feuille	tampon	MF ₂	VMTc	MF ₂	TC	MF ₂	MF ₂	MF ₂
1 ^{ère} feuille	tampon	TC	VMTc	TC	TC	TC	MF ₂	TC
2 ^{ème} feuille	tampon	MF ₂	VMTc	MF ₂	TC	MF ₂	MF ₂	MF ₂
3 ^{ème} feuille	tampon	VMTc	VMTc	VMTc	TC	VMTc	MF ₂	VMTc
1 ^{ère} feuille	tampon	MF ₂	VMTc	MF ₂	TC	MF ₂	MF ₂	MF ₂
2 ^{ème} feuille	tampon	VMTc	VMTc	VMTc	TC	VMTc	MF ₂	VMTc
3 ^{ème} feuille	tampon	TC	VMTc	TC	TC	TC	MF ₂	TC

En première inoculation, chaque plante n'est infectée que par un seul virus (ou du tampon); en seconde inoculation chacune est infectée par les trois virus.

Sept jours plus tard, les diamètres des lésions apparues sur les demi-feuilles droites sont mesurées à l'aide d'un microscope équipé d'un micromètre oculaire (précision de 10^{-3} mm); la dimension D (fig. 2) d'une lésion résulte de la moyenne entre deux mesures A et B effectuées perpendiculairement sur la lésion. En ce qui concerne les témoins, la première inoculation est réalisée en frottant la demi-feuille gauche avec du tampon phosphate-NaCl. Il a été montré que les lésions mécaniques, aussi bien que les lésions virales, induisent la synthèse d'inhibiteurs de type polyphénols (Martin, 1959; Farkas et al.; 1960). En vue d'éliminer, ou tout au moins de diminuer, le facteur d'"individualité" de réponse de chaque plante, les secondes inoculations sont réalisées en effectuant une rotation selon le tableau B. Chaque expérience exige donc un minimum de 12 plantes.



Diamètre : $\frac{A + B}{2} = D$

Figure 2 : Mesure des lésions.

TABLEAU C : *Vérification des propriétés des trois souches de VMT.*

Souche	Température	Concentration µg/disque	% par rapport à VMTc
VMTc	16° C	308	100
TC		56	<u>18</u>
MF ₁		144	47
MF ₂		292	<u>95</u>
VMTc	36° C	26	100
TC		720	<u>2 770</u>
MF ₁		6	23
MF ₂		6,5	<u>25</u>

Le chiffre donné en concentration de virus par disque est la moyenne de quatre dosages effectués chacun sur un groupe de cinq disques. Il apparaît nettement que la souche TC est une souche très thermophile et que la souche MF₂ est une souche thermosensible.

RESULTATS

I° - vérification des propriétés des trois souches de VMT.

Nous avons vérifié que la souche MF₂ est une souche thermosensible, et qu'elle se développe comme la souche VMTc à toutes les températures, orms les températures supra-optimales et, que la souche TC est un souche thermophile et se développe donc très bien à ces températures supra-op. males.

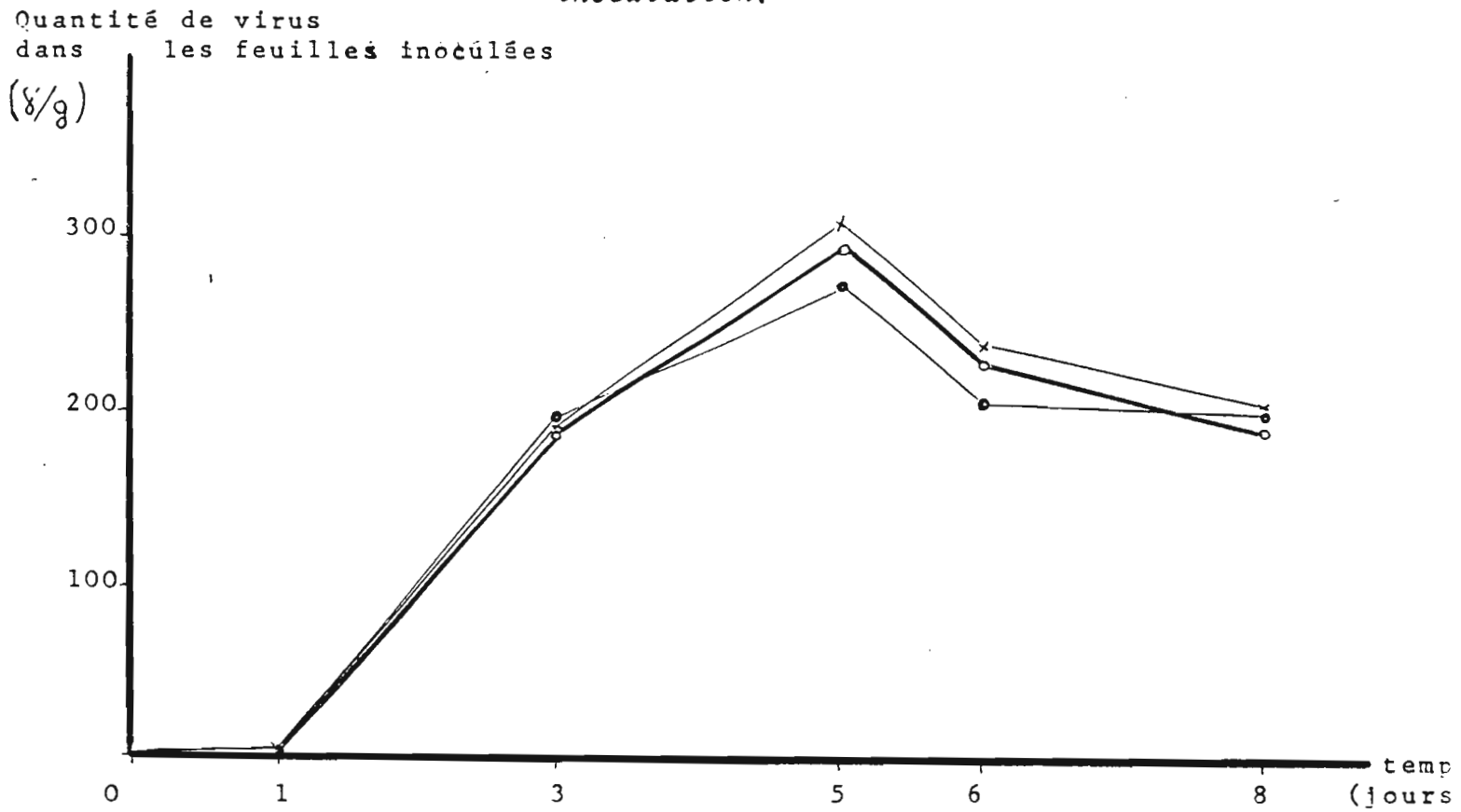
Nous avons mis en culture, dans des fioles à toxine thermostatées à 16°C et à 36°C, des disques découpés dans des feuilles de *N. tabacum* L. var. Judy Pride, inoculés avec des solutions virales à 200 µg/ml. Quatre fioles sont maintenues à chaque température, chacune contenant 20 disques infectés par du VMTc, du TC, du MF_I ou du MF₂. La souche MF_I est aussi une souche thermosensible du VMT, ayant la particularité d'induire la formation de lésions nécrotiques à des températures inférieures à 24°C, sur *N. tabacum* L., var. Judy Pride, alors que les autres plantes s'y développent d'une façon systémique. Cette souche MF_I est utilisée comme souche comparative de la souche MF₂.

Les disques sont récoltés 7 jours après l'inoculation, broyés par groupe de 5 et dosés sérologiquement.

Le dosage sérologique des protéines virales est effectué selon la méthode de Folin et Ciocalteu (1927), modifiée par Lowry et ses collaborateurs (1951). Cette méthode a été appliquée par Lebourier et Hirth (1966) au dosage des quantités de VMT dans les feuilles et disques de feuilles de Tabac. Elle permet l'évaluation des quantités d'antigènes viraux variant de 10 à 120 µg/ml. L'un des avantages majeurs de la méthode réside dans le fait qu'elle ne nécessite pas la purification préalable du virus, par suite de la très grande spécificité de l'anti-sérum de VMT obtenu par injection, à des Lapins, de suspensions de virus hautement purifiées.

Le tableau C donne le résultat des dosages pour chacune des souches et pour les deux températures.

Figure 3 : Evolution de la concentration virale dans les feuilles après la première inoculation.



Les quantités de virus présentes dans les plantes varient identiquement pour les trois souches, atteignant un maximum dès le cinquième jours.

○ — ○ VMTc
● — ● TC
× — × MF₂

Il en résulte que les souches VMTc et MF₂ se développent identiquement à 16°C, mais que la souche MF₂ se développe quatre fois moins que la souche VMTc à 36°C (5 jours de culture): la souche MF₂ est donc bien thermosensible. La souche thermosensible MF₁ se développe d'ailleurs identiquement à la souche MF₂ à 36°C.

De ce tableau, il découle aussi que la souche TC se développe de 24 à 30 fois plus que la souche VMTc à 36°C, et de 5 à 6 fois moins que la souche VMTc à 16°C: la souche TC est donc une souche très thermophile.

2° - évaluation des concentrations virales dans les feuilles après la première inoculation.

Afin d'obtenir des résultats comparables, nous avons dosé la quantité de virus dans les plantes après la première inoculation. Ce dosage s'imposait car les taux de multiplication des trois souches de virus dans les plantes à infection généralisée sont différents, à la température considérée (22°C).

Les plantes sont préparées ainsi qu'il est décrit page 8. Elles sont infectées avec une solution de virus à 2 µg/ml, ce qui permet de réaliser une virose très intense sur chaque demi-feuille frottée. Chaque plante est inoculée avec une seule souche; 12 plantes (4 pour chaque souche) sont traitées ainsi. L'inoculation est effectuée sans rotation, afin de se placer exactement dans les conditions des expériences d'évaluation des potentiels d'interférence. 1, 3, 5, 6 ou 8 jours après l'inoculation, les demi-feuilles sont récoltées, posées et broyées afin de doser sérologiquement les quantités de virus présentes.

Les résultats (fig. 3) montrent que les trois souches donnent des quantités semblables de virus, cinq jours après l'inoculation et que la cinétique de développement paraît être la même dans les trois cas. Ceci s'explique aisément car la concentration de virus utilisée est largement supérieure à la concentration de virus ~~minimale~~ (0,5 µg/ml, permettant l'obtention de lésions isolées. Dans nos conditions, les

TABLEAU D : Variation de la taille des lésions nécrotiques en fonction de la température.

Température moyenne	Souche	Nombre de mesures	∅(mn) lésions	Taille relative*
17° C	VMTc	60	2,60	100
	TC	60	2,28	88
	<u>MF₂</u>	60	3,16	121
22° C	<u>VMTc</u>	60	4,31	100
	TC	60	3,49	81
	MF ₂	60	4,17	97
28° C	VMTc	30	4,92	100
	<u>TC</u>	30	5,26	107
	MF ₂	30	4,87	99

Les souches soulignées sont celles qui donnent les lésions les plus grandes ; la température correspondante est la température la plus proche de la température optimale de développement du virus.

* L'évaluation est faite par rapport à la taille des lésions induites par l'inoculation du VMTc.

lésions, très rapprochées (300 à 500 par demi-feuille), sont rapidement coallescentes, ce qui détermine un dessèchement de la feuille dès le cinquième jour après l'inoculation. On ne pourra donc expliquer des différences d'inhibition, lors de la seconde inoculation, par l'existence de quantités différentes de virus dans les plantes après la première inoculation.

3° - action de la température sur la taille des lésions.

Des expériences préliminaires ne comportant qu'une seule inoculation de virus (0,05 µg/ml) ont été réalisées à différentes températures. Pour chaque inoculation et ceci avec chaque souche de virus une double rotation est effectuée sur chaque plante, selon le schéma suivant, ceci dans le but d'éliminer l'effet de position des feuilles sur chaque plante.

	1° plante		2° plante		3° plante	
	gauche	droite	gauche	droite	gauche	droite
1° feuille	VM ₁ c	VM ₁ c	TC	MF ₂	MF ₂	TC
2° feuille	TC	TC	MF ₂	VM ₁ c	VM ₁ c	MF ₂
3° feuille	MF ₂	MF ₂	VM ₁ c	TC	TC	VM ₁ c

Les plantes sont laissées 7 jours à chaque température. Cinq lésions, prises au hasard, sont mesurées au centre de chaque feuille et un minimum de trente mesures est exigé pour avoir un résultat statistiquement valable. Trois plantes, au minimum, sont donc nécessaires pour effectuer ce test.

Trois expériences ont été réalisées: à température moyenne de 17°C (± 2°C), à 22°C (± 2°C) et à 28°C (± 2°C). Les résultats sont donnés par le tableau D. Pour chaque souche, la taille des lésions croît en fonction de la température, mais les lésions les plus grandes sont

TABLEAU E : *Détail des mesures effectuées.*

Nombre de jours entre les 2 inocul.	1 ^{ère} inoc.	2 ^{ème} inoc.	Lésions induites par la 2 ^{ème} inoculation			
			Nombre de lectures	Moyenne des ϕ des lésions (mm)		
				Témoins	Tests	% = (test/témoin)100
3 jours	VMTc	VMTc	45	3,23	3,02	93
	TC	VMTc	45	3,23	3,21	99
	MF ₂	VMTc	45	3,23	3,20	98
7 jours	VMTc	VMTc	30	5,24	2,48	47
	VMTc	TC	30	4,19	2,71	65
	VMTc	MF ₂	30	4,66	3,14	67
	TC	VMTc	30	5,24	3,38	65
	TC	TC	30	4,19	3,31	79
	TC	MF ₂	30	4,66	3,61	77
	MF ₂	VMTc	30	5,24	2,35	45
	MF ₂	TC	30	4,19	2,87	69
	MF ₂	MF ₂	30	4,66	2,92	63
10 jours	VMTc	VMTc	60	3,26	0,72	22
	VMTc	TC	60	2,15	0,71	34
	VMTc	MF ₂	60	2,68	0,78	29
	TC	VMTc	60	3,24	1,91	59
	TC	TC	60	2,15	1,38	64
	TC	MF ₂	60	2,68	1,68	68
	MF ₂	VMTc	60	3,26	0,67	21
	MF ₂	TC	60	2,15	0,81	38
	MF ₂	MF ₂	60	2,68	0,86	32
15 jours	VMTc	VMTc	30	3,81	0,83	22
	VMTc	TC	30	3,21	0,99	32
	VMTc	MF ₂	30	3,64	1,06	29
	TC	VMTc	30	3,81	2,00	52
	TC	TC	30	3,21	1,85	58
	TC	MF ₂	30	3,64	2,13	59
	MF ₂	VMTc	30	3,81	0,86	23
	MF ₂	TC	30	3,21	1,00	32
	MF ₂	MF ₂	30	3,64	0,96	22

Les quatre expériences ont été effectuées les unes après les autres ; cependant, l'âge des plantes et les conditions de l'expérimentation sont les mêmes dans tous les cas afin de rendre comparables les résultats. On constate donc une interférence maximale dès le dixième jour après la première inoculation. Chaque plante reçoit en première inoculation une souche et en deuxième inoculation les trois souches.

fournies par la souche thermosensible MF₂ à 17°C, par la souche commune VMTc à 22°C et par la souche thermophile TC à 28°C.

Pour chaque souche, nous constatons que la moyenne des diamètres des lésions induites varie beaucoup selon la température de l'expérience; cette variation est de 30% environ et les différences observées sont significatives.

A une température donnée, nous constatons que les moyennes des diamètres des lésions induites par chacune des trois souches sont différentes; les valeurs observées ne sont pas toujours statistiquement différentes, car les variations restent faibles (5 à 10%); mais il faut constater que c'est la souche qui se développe à la température la plus proche de sa température optimale de développement qui donne les tailles des lésions les plus grandes.

Cette expérience montre que la température entraîne un comportement différent des trois souches, ce qui confirme que nos trois souches sont différentes.

La température de 22°C a été choisie comme température de nos expériences ultérieures parce qu'elle se trouve être voisine de la température optimale de développement des souches VMTc (24°C) et MF₂ (souche thermosensible); la température optimale du TC (36°C) ne permet pas l'étude des potentiels d'interférence tel que nous l'envisageons (mesure des diamètres des lésions) car, au delà de 28°C, les lésions nécrotiques se forment mal et deviennent diffuses; à 36°C; aucune lésion ne se forme et l'infection devient généralisée.

4° - étude des potentiels d'interférence des trois souches de virus.

L'étude de l'interférence a été réalisée en suivant le protocole expérimental décrit pages 10 et 11

Le tableau E donne le détail des mesures des lésions pour quatre expériences différentes, en fonction du temps écoulé entre les deux inoculations, soit 3, 7, 10, et 15 jours. Le premier intervalle de temps (3 jours) constitue la limite inférieure nécessaire (Loebenstein et Ross, 1963) au développement du virus, à la synthèse des substances

TABLEAU F : Comparaison des potentiels d'interférence en fonction du temps.

1 ^{ère} inoc. 2 ^{ème} inoc.	VMTc	TC	MF ₂		TEMPS ENTRE 1 et 2
VMTc	0,07	0,04	0,02	3	
	0,53	0,35	0,55	7	
	0,78	0,41	0,79	10	
	0,78	0,48	0,77	15	
TC	0,01	0,02	0,00	3	
	0,35	0,21	0,31	7	
	0,66	0,36	0,62	10	
	0,69	0,42	0,69	15	
MF ₂	0,01	0,01	0,03	3	
	0,33	0,23	0,37	7	
	0,71	0,43	0,68	10	
	0,71	0,41	0,75	15	

Les souches VMTc et MF₂ donnent, en tant qu'inhibiteurs, des résultats comparables, différents de ceux donnés par la souche TC : elles sont plus inhibitrices. La souche VMTc est la plus sensible, ensuite, la souche MF₂, puis la souche TC, à l'inhibiteur induit par chacune des 3 souches.

$$\text{Potentiel d'interférence : } 1 = \frac{\text{Ølésions test}}{\text{Ølésion témoin}}$$

inhibitrices et à leur diffusion vers l'autre moitié de la feuille; le dernier intervalle constitue la limite supérieure, due à l'âge des feuilles, à partir de laquelle leur sensibilité diminue rapidement (20 à 30 lésions par demi-feuille au lieu de 200 à 400 pour un inoculum de 2 µg/ml).

Les "potentiels d'interférence" p (Loebenstein et Ross, 1963) permettent une expression aisée de nos résultats (Tableau F). Cette méthode donne une représentation chiffrée et graphique d'après l'équation:

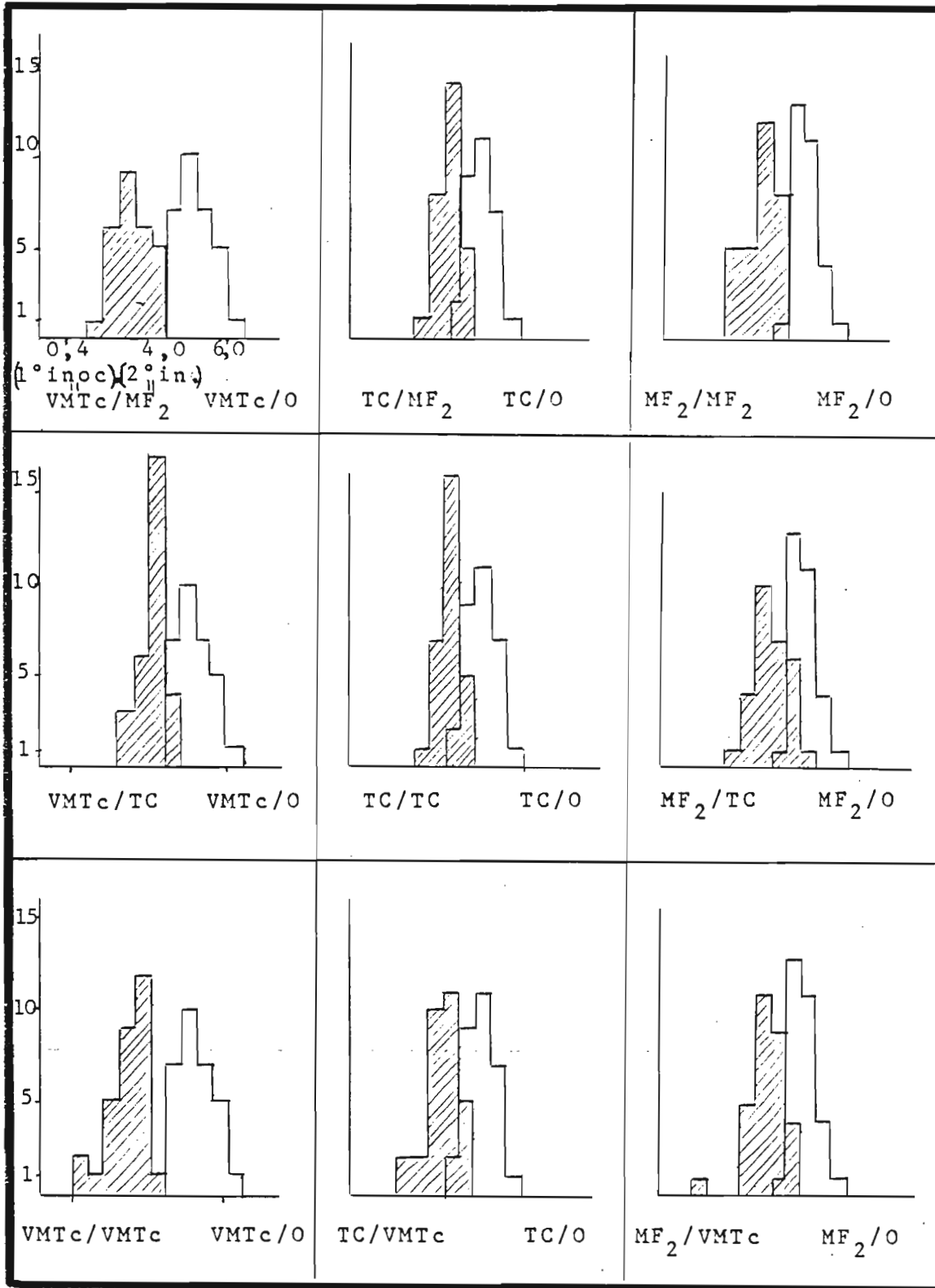
$$p = I - \frac{M}{M_t}$$

dans laquelle p est le potentiel d'interférence d'une souche A (deuxième inoculation) par rapport à une souche B (première inoculation), M étant la moyenne des diamètres des lésions de la souche A inhibée et M_t la moyenne des diamètres des lésions de la même souche A sans inhibition (témoin); lorsque l'interférence est maximale (cas des lésions ponctuelles), p est voisin de I ; lorsqu'elle est minimale (cas où les diamètres sont identiques), p est nul.

5° - analyse statistique .

Les résultats du tableau F montrent des écarts sensibles entre les différents potentiels d'interférence; encore ces résultats doivent-ils être interprétés statistiquement. Aucun auteur n'ayant utilisé de test statistique pour l'interprétation des mesures de diamètres de lésions, il restait à en trouver un convenable. Il s'agit de comparer entre elles des populations de mesures de diamètres. Disposant de mesures quantitatives, nous avons étudié l'écart des moyennes à l'aide du test de Student-Fisher, dit encore "de l'hypothèse nulle" (Schwartz, 1963). L'emploi de ce test repose cependant, sur l'hypothèse bien précise que la loi de distribution des populations étudiées peut être considérée comme normale, c'est-à-dire gaussienne. Or, dans nos expériences, chaque population est théoriquement la somme de trois sous-populations, mesures des lésions des feuilles inférieures, des

Histogrammes des populations de mesures de lésions de l'expérience d'intervalle 7 jours entre les deux inoculations.



Bien que chaque population soit formée de 3 sous-populations, mesures des lésions des feuilles inférieures, des feuilles intermédiaires et les feuilles supérieures, chacune peut être considérée comme gaussienne.

feuilles intermédiaires et des feuilles supérieures, puisque la sensibilité des feuilles d'une même plante varie selon sa position. L'étude des histogrammes montre, pourtant, que les trois quarts de nos populations suivent une loi normale et que le reste est assimilable, ce qui permet l'utilisation du test de Student-Fisher.

Les tableaux G montrent un exemple de ce test appliqué à l'expérience dont l'intervalle entre les deux inoculations est de 7 jours. Il s'agit donc de comparer les potentiels d'interférence, soit

$$p_1 = I - \frac{m_1}{m_{t1}} \quad \text{avec} \quad p_2 = I - \frac{m_2}{m_{t2}} \quad \text{et donc} \quad \frac{m_1}{m_{t1}} \quad \text{avec} \quad \frac{m_2}{m_{t2}} .$$

Dans le cas où les virus de la seconde inoculation sont les mêmes, les deux diamètres témoins sont les mêmes ($m_{t1} = m_{t2}$) et la comparaison est réduite à l'étude de m_1 par rapport à m_2 .

Dans le cas où les virus de la seconde inoculation sont différents, la comparaison entre m_1 et m_2 n'est possible que si l'écart entre m_1 et m_2 est nul ou varie en sens inverse de l'écart entre m_{t1} et m_{t2} ; dans ce cas, la comparaison se réduit aussi à l'étude de m_1 par rapport à m_2 .

La formule du t de Student-Fisher est :

$$t = \frac{|m_1 - m_2|}{\sqrt{\frac{s_1^2}{n_1 - 1} + \frac{s_2^2}{n_2 - 1}}}$$

où s_1^2 et s_2^2 sont les variances des populations de moyennes m_1 et m_2 à comparer et d'effectifs n_1 et n_2 (30 ici).

Le degré de liberté est $n_1 + n_2 - 2 = 58$, au seuil de 5%; la différence n'est pas alors significative pour $t < 1,96$; dans le cas où $t > 1,96$, elle est significative.

TABLEAUX G : APPLICATION DU TEST DE STUDENT-FISHER
A L'EXPERIENCE D'INTERVALLE 7 JOURS

TABLEAU G₁ : *Analyse statistique des témoins (pas de virus en première inoculation).*

1 ^{ère} inoc.	2 ^{ème} inoc.	Ømn des lésions	t		
			VMTc/TC	TC/MF ₂	MF ₂ /VMTc
tampon	VMTc	5,24	6,1	5,0	3,7
tampon	TC	4,18			
tampon	MF ₂	4,66			

La valeur 6,1 est, par exemple, la valeur de t obtenue en comparant la moyenne des diamètres des lésions induites par la souche VMTc, sans inhibition due à un virus, et la moyenne des diamètres des lésions induites par la souche TC, dans les mêmes conditions.

Les trois valeurs trouvées sont significativement différentes ($t > 1,96$). Ces résultats confirment que les trois souches utilisées sont différentes.

Légende des tableaux G₂, G₃ et G₄ :

Pour voir s'il existe une différence entre les pouvoirs inhibiteurs des trois souches de VMT, il suffit d'infecter les plantes avec les trois souches (une par plante) en première inoculation, contre une même souche en seconde inoculation (soit VMTc, ou TC, ou MF₂).

Il s'agit de comparer dans ces tableaux les valeurs de p (potentiels d'interférence), ce qui se ramène à comparer les moyennes des diamètres (page I7).

La valeur 5,6, par exemple, est la valeur de t obtenue en comparant la moyenne des diamètres des lésions induites par la souche VMTc (deuxième inoculation), inhibée par la souche VMTc (première inoculation, et la moyenne des diamètres des lésions induites par la souche VMTc (deuxième inoculation), inhibée par la souche TC (première inoculation). Cette valeur représente donc la comparaison entre les pouvoirs inhibiteurs des souches VMTc et TC (rapport indiqué VMTc/TC dans le tableau G₂).

Seuls les résultats soulignés indiquent des différences non-significatives, ce qui montre que la souche VMTc est autant inhibitrice que la souche MF₂ (t I,96), et que la souche TC l'est beaucoup moins.

Ces trois tableaux donnent des résultats comparables, ce qui est normal car seule la nature de la première inoculation est importante.

Les valeurs de p ont été données à titre purement indicatif, afin d'apprécier rapidement les résultats.

ANALYSE STATISTIQUE DES POUVOIRS INHIBITEURS DES TROIS SOUCHES DE VMT.

TABLEAU G₂ : Analyse des pouvoirs inhibiteurs (VMTc en deuxième inoculation).

1 ^{ère} inoc.	2 ^{ème} inoc.	Ømn lés.	p	t		
				VMTc/TC	TC/MF ₂	MF ₂ /VMTc
VMTc	VMTc	2,48	0,53			
TC	VMTc	2,39	0,35	5,6	5,2	<u>0,6</u>
MF ₂	VMTc	2,35	0,53			

TABLEAU G₃ : Analyse des pouvoirs inhibiteurs (TC en deuxième inoculation).

1 ^{ère} inoc.	2 ^{ème} inoc.	Ømn lés.	p	t		
				VMTc/TC	TC/MF ₂	MF ₂ /VMTc
VMTc	TC	2,71	0,35			
TC	TC	3,31	0,21	4,7	3,8	<u>1,1</u>
MF ₂	TC	2,87	0,31			

TABLEAU G₄ : Analyse des pouvoirs inhibiteurs (MF₂ en deuxième inoculation).

1 ^{ère} inoc.	2 ^{ème} inoc.	Ømn lés.	p	t		
				VMTc/TC	TC/MF ₂	MF ₂ /VMTc
VMTc	MF ₂	3,14	0,33			
TC	MF ₂	3,61	0,23	2,8	4,3	<u>1,2</u>
MF ₂	MF ₂	2,92	0,37			

Légende de tableaux G₅, G₆ et G₇ :

Pour voir s'il existe une différence de sensibilité entre les trois souches de VMT, il suffit d'infecter les plantes avec une seule souche (VMTc ou TC ou MF₂) en première inoculation, contre les trois souches en deuxième inoculation.

Il s'agit donc de comparer, par exemple, :

$$p_1 = I - \frac{VMTc}{VMTc_t} \text{ avec } p_2 = I - \frac{MF_2}{MF_{2t}}, \text{ soit } \frac{VMTc}{VMTc_t} \text{ avec } \frac{MF_2}{MF_{2t}} \text{ (page 17).}$$

Nous avons montré que la moyenne des diamètres des lésions induites par VMTc, sans inhibition par un virus, (VMTc_t) est significativement différente et plus grande que la valeur correspondant à MF₂ (Tableau G₁). Ainsi, pour que p₁ diffère de p₂, il suffit que la moyenne des diamètres des lésions induites par la souche VMTc, inhibée par la souche VMTc, la souche TC ou la souche MF₂, soit égale ou inférieure à la valeur correspondant à MF₂, ce qui est le cas ici. Les souches VMTc et MF₂ sont donc différentes du point de vue de la sensibilité aux inhibiteurs induits par les trois souches de VMT, et la souche VMTc est plus sensible que la souche MF₂.

De même, nous avons montré que la moyenne des diamètres des lésions induites par VMTc, sans inhibition par un virus, est significativement différente et plus grande que la valeur correspondant à TC (Tableau G₁). Pour que les potentiels d'interférence diffèrent, il suffit donc que la moyenne des diamètres des lésions induites par VMTc, inhibée par l'une des trois souches, soit égale ou inférieure à la valeur correspondant à TC. Cependant, il faut remarquer que, si cette différence observée est dans le sens inverse, il ne s'agira pas alors d'une conclusion opposée mais d'une impossibilité de discuter. (Tableau G₇) Les souches VMTc et TC sont différemment sensibles aux inhibiteurs induits par les trois souches et, la souche VMTc est plus sensible que la souche TC.

Un raisonnement identique peut être tenu pour comparer les sensibilités des souches MF₂ et TC. Il en résulte que la souche MF₂ est plus sensible que la souche TC.

Nous pouvons donc classer les trois souches par ordre de sensibilité croissante aux trois souches: TC, MF₂ et VMTc.

ANALYSE STATISTIQUE DES SENSIBILITES DES TROIS SOUCHES DE VMT.

TABLEAU G₅ : Analyse des sensibilités (VMTc en première inoculation).

1 ^{ère} inoc.	2 ^{ème} inoc.	Ømm lésions	p	t		
				VMTc/TC	TC/MF ₂	MF ₂ /VMTc
VMTc	VMTc	2,48	0,53			
VMTc	TC	2,71	0,35	<u>1,2</u>	2,1	<u>3,7</u>
VMTc	MF ₂	3,14	0,33			

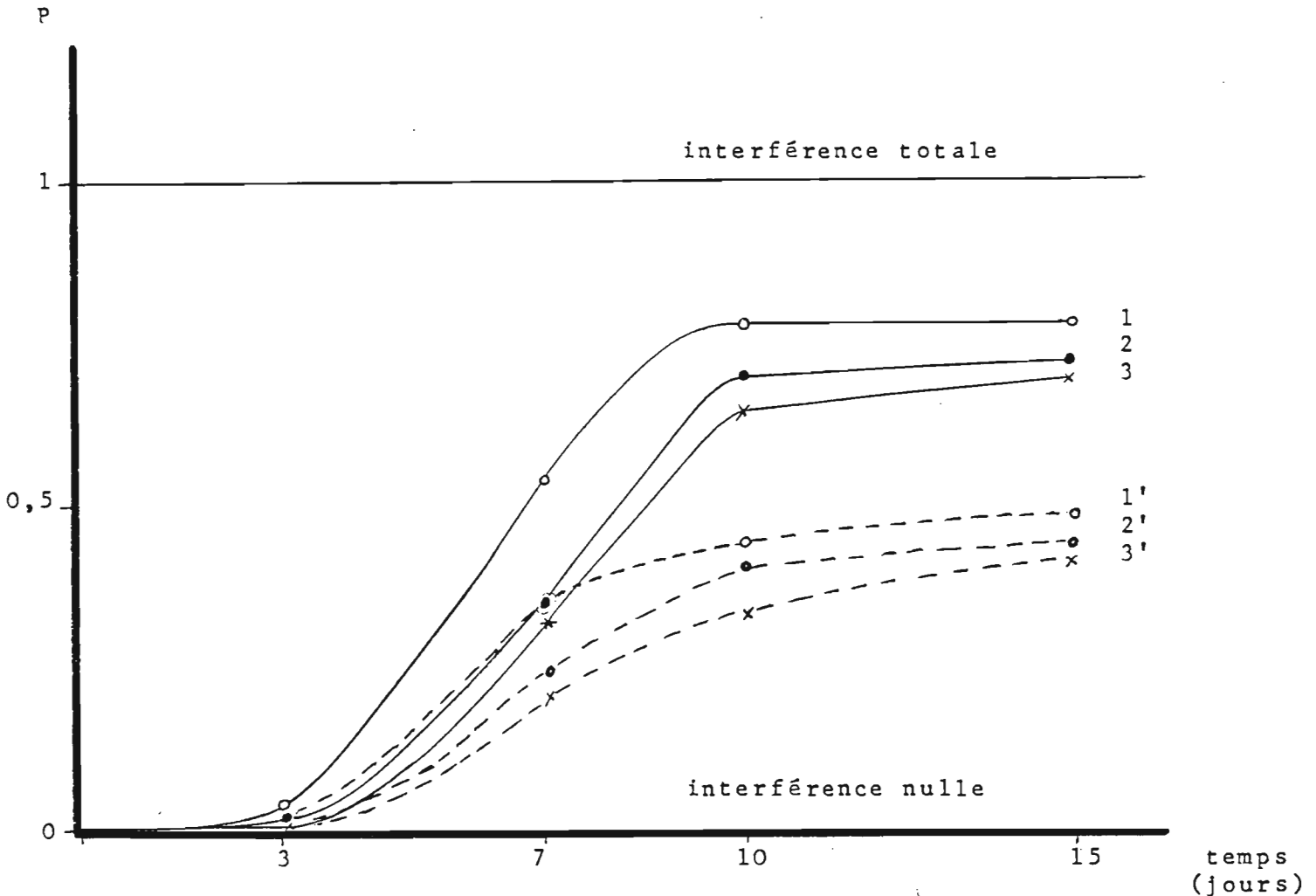
TABLEAU G₆ : Analyse des sensibilités (TC en première inoculation).

1 ^{ère} inoc.	2 ^{ème} inoc.	Ømm lésions	p	t		
				VMTc/TC	TC/MF ₂	MF ₂ /VMTc
TC	VMTc	3,38	0,35			
TC	TC	3,31	0,21	<u>1,8</u>	3,3	2,2
TC	MF ₂	3,61	0,23			

TABLEAU G₇ : Analyse des sensibilités (MF₂ en première inoculation).

1 ^{ère} inoc.	2 ^{ème} inoc.	Ømm lésions	p	t		
				VMTc/TC	TC/MF ₂	MF ₂ /VMTc
MF ₂	VMTc	2,35	0,53			
MF ₂	TC	2,87	0,31	2,3	<u>0,28</u>	2,8
MF ₂	MF ₂	2,92	0,37			

Figure 4 : Variation des potentiels d'interférence en fonction de l'intervalle de temps entre les deux inoculations.



- Le décalage entre la courbe 1 (VMTc ou MF₂ inhibiteur) et la courbe 1' (TC inhibiteur) représente la différence de pouvoir inhibiteur entre les souche VMTc (ou MF₂) et TC.

La différence est maximale le dixième jour après la première inoculation.

- Le décalage entre la courbe 1 et la courbe 2 représente la différence de sensibilité à l'inhibiteur entre la souche VMTc et la souche MF₂ ; celle-ci est maximale le septième jour après la première inoculation.

	2° inoc.	1° inoc.		2° inoc.	1° inoc.
1	VMTc	VMTc ou MF ₂	1'	VMTc	TC
2	TC		2'	TC	
3	MF ₂		3'	MF ₂	

IL apparaît donc que les souches VM₁c et MF₂ ont des pouvoirs inhibiteurs identiques (test statistique), mais différents de celui de la souche TC.

Par contre, les trois souches ont des sensibilités différentes aux inhibiteurs induits par chacune d'elles; la souche VM₁c est la plus sensible et la souche TC est la moins sensible.

Ces conclusions, obtenues pour l'expérience n° 4^u laquelle l'intervalle de temps entre les deux inoculations est de 7 jours, sont aussi valables pour les deux expériences pour lesquelles l'intervalle de temps est de 10 et de 15 jours.

Par ailleurs, nous constatons que l'interférence maximale semble atteinte pour un intervalle de 10 jours.

Nous avons tracé les courbes des potentiels d'interférence en fonction du temps séparant les deux inoculations, confondant les courbes des potentiels de VM₁c (TC ou MF₂) par rapport à VM₁c et les potentiels de VM₁c (TC ou MF₂) par rapport à MF₂, les différences étant trop faibles et non significatives (fig. 4).

DISCUSSION

Nous avons mis en évidence l'existence d'inhibiteurs dans les plantes, infectées par trois souches du VMT, et maintenues à la température optimale de l'une d'elle. Nous avons aussi montré que ces trois souches possèdent des pouvoirs inhibiteurs différents (VMTc et MF₂ sont également inhibiteurs et TC l'est beaucoup moins), et des sensibilités différentes à ces inhibiteurs (VMTc est plus sensible que MF₂, celle-ci l'étant plus que TC). Ces inhibiteurs peuvent être de types divers, soit des polyphénols et des polyphénol-oxydases, soit des protéines inhibitrices.

I° - Nature des inhibiteurs responsables de l'interférence virale dans les plantes.

a) polyphénols et polyphénol-oxydases:

Diverses observations ont montré l'accumulation de polyphénols et l'exaltation de l'activité des polyphénol-oxydases dans les plantes, phénomènes qui seraient liés à la manifestation d'une réaction de défense des cellules vis à vis d'un agent infectieux (Kiraly et Farkas, 1958; Williams, 1959; Kikuchi et Yamaguchi, 1960).

Une étude plus précise (Martin, 1959) de l'activité de la polyphénol-oxydase chez le Tabac (*N. tabacum* L., var. Samsun) virosé, montre que celle-ci augmente de 168% par rapport à ce qu'elle est chez les plantes saines. L'accumulation de polyphénols est aussi décelée dans ces plantes: acide chlorogénique (+ 100%) acide isochlorogénique et

polyphénols liés à l'acide caféique, les différences s'estompant avec l'âge de la plante et l'approche de la floraison.

Une étude plus récente (Parish et al., 1965) indique que le phénomène de formation des lésions nécrotiques fait intervenir les polyphénols et les polyphénol-oxydases ainsi que d'autres facteurs; une addition de polyphénols active l'apparition des centres nécrotiques d'environ 12 heures (souche U₂ de VMT sur *Nicotiana sylvestris*).

Cependant, l'action de ces diverses substances serait aspécifique: la production des polyphénols peut aussi bien être induite par la présence d'un virus que par une simple action mécanique. Il se pourrait toutefois, que certaines souches de virus induisent des quantités différentes de polyphénols, ce qui provoquerait un état d'interférence.

b) protéines inhibitrices:

Il est évident de penser que des protéines analogues à l'interféron, substance inhibitrice induite par des virus chez les animaux, pourraient être comptées parmi les responsables de l'interférence virale chez les plantes. (voir annexe).

Des essais d'identification de ces protéines ont été effectués par Loebenstein et Ross (1963) et Sela et Applebaum (1965).

Loebenstein (1960; 1963) suggère que la résistance induite dans une partie de plante par infection dans une autre région de cette même plante peut être due à un mécanisme identique à celui de l'interféron.

Un "agent interférant" (Interfering Agent), extrait de *Datura stramonium* et *Nicotiana tabacum* virosés, est étudié par Loebenstein et Ross (1963): il s'agit d'une protéine de poids moléculaire beaucoup plus faible que celui du virus, différente de la protéine X virale (Takahashi et Ishii, 1952), qui s'accumule dans les seuls tissus infectés. Cet "agent interférant" joue probablement un rôle dans la résistance induite car sa concentration est plus importante dans les tissus résistants que dans les autres et son développement au cours du temps est plus ou moins parallèle à celui de la résistance. De plus, il n'est pas spécifique du virus.

Sela et Applebaum (1962) ont extrait de plants de Tabac virosés un "facteur antiviral" (Antiviral Factor), absent dans les plantes saines et dont les propriétés ont été étudiées par Sela et al. (1965). Il s'agit d'une nucléoprotéine à RNA ressemblant à l'interféron par plusieurs propriétés biologiques. Tous deux possèdent une activité antivirale, sont produits seulement dans les tissus virosés, diffusent aisément d'une cellule infectée à une saine et n'ont aucune spécificité vis à vis des virus. Ce facteur extrait de *Nicotiana glutinosa* L. infecté par du VMT, ou de *Datura stramonium* L. infecté par le virus de la Mosaïque du Concombre, est actif contre divers virus dans des plantes très différentes: *N. glutinosa* (Solanacées), *Zinnia elegans* (Composées) et *Gomphrena globosa* (Amarantacées). Il ne semble donc pas spécifique de l'hôte, alors que l'interféron le serait (Isaacs, 1963). Ce dernier point est cependant contestable car l'interféron, qui est une protéine et donc antigénique, est dosé dans des systèmes animaux, c'est-à-dire susceptible de produire des anticorps et ainsi capable d'amoindrir l'action de l'interféron, alors que les facteurs antiviraux sont dosés chez des plantes incapables de produire des anticorps.

Ces substances inhibitrices extraites de plantes ne peuvent être admises avec certitudes comme étant des interférons dégradés par les méthodes d'isolement, tout en conservant certaines de leurs propriétés. En effet, dans les cas cités ci-dessus, les substances inhibitrices sont isolées à partir de Tabac (*N. glutinosa* L., ou *N. tabacum* L.), infecté par du VMT; Loebenstein et Ross, et Sela et Applebaum auraient donc dû obtenir la même substance ou des substances ayant des propriétés très voisines.

2° - Interprétation des résultats.

Il reste à essayer d'interpréter les différences enregistrées entre les propriétés d'interférence des trois souches de VMT.

Les souches VMTc et MF₂ inhibent également la souche VMTc (ou la souche MF₂); ce fait suggère que les substances inhibitrices synthétisées sont identiques. Il est donc logique de penser que la (ou les) substance inhibitrice induite par la souche TC serait aussi identique.

mais produite à un degré moindre, ce qui expliquerait que les souches sont moins inhibées par la substance induite par la souche TC que par celles induites par les autres, la quantité de ribosomes normaux restant alors relativement plus importante quand la souche TC produit la substance inhibitrice (voir Annexe: Mécanisme d'action de l'interféron, par Marcus et Salb, 1966).

Il est plus difficile d'expliquer pourquoi la souche MF₂ est moins inhibée que la souche VM₁c par la souche VM₁c (ou la souche MF₂).

Cette sensibilité vis à vis d'une substance inhibitrice donnée pourrait être liée à la synthèse de protéines secondaires par le virus (Marcus et Salb, 1966), réprimant, par exemple, plus ou moins les sites des polysomes composés de ribosomes et de T.I.P. (Translation Inhibitory Protein). Gosh et Gifford (1965) ont mis en évidence une telle protéine dans les cultures de cellules embryonnaires de Poulet, protéine qui code pour "déréprimer" le codon de la thymidine-kinase du génome cellulaire. Ils ont étudié deux souches du virus de la vaccine, une souche normale et une souche thymidine-kinase⁻; la multiplication de la souche normale est accompagnée de l'augmentation de l'activité de la thymidine-kinase, alors que la souche mutée ne l'est pas. Un traitement des cellules par l'interféron entraîne une inhibition de la multiplication du virus, de l'activité de la thymidine-kinase et donc de l'incorporation de la thymidine dans l'ADN des virus.

La production de cette protéine secondaire peut d'ailleurs varier avec les conditions dans lesquelles se trouvent les cellules hôtes et les virus, notamment avec la température. En effet, il semblerait que la production et l'action de l'interféron sont liées aux conditions de température auxquelles sont maintenues les cellules et les virus. Ruiz-Gomez et Isaacs (1963a) ont étudié onze virus d'animaux dont les températures optimales varient de 32°C à 42°C et ont montré une bonne correspondance entre la température optimale de développement et la sensibilité de ces virus à l'interféron. Dans un second article (1963b), ils mettent en évidence que les virus ayant les températures de multiplication optimales les plus élevées induisent la synthèse la moins grande d'interféron.

Nos expériences, effectuées à la température moyenne de 22°C voisine des températures optimales de développement des souches VM₁c et MF₂ (souche thermosensible se multipliant d'une façon optimale sur une très large plage de température) sont en accord avec ces faits. Il semble que la production de substances inhibitrices est d'autant meilleure que les souches inductrices se développent à leur température optimale et d'autant plus faible que la température optimale de développement du virus est élevé.

Il serait évidemment intéressant de contrôler ces faits par une étude effectuée à la température optimale de développement de la souche TC, soit 36°C, mais, au delà de 28°C, le processus de défense des plantes hypersensibles se trouve inhibé; les virus diffusent alors dans toute la plante et il n'y a plus formation de lésions locales. Par ailleurs, l'étude future de l'action de l'actinomycine-D permettra de préciser le rôle et la nature des substances concourant à la formation de l'état d'interférence, dans les plantes infectées par le VM₁c et ses différentes souches.

Rien ne permet donc d'affirmer, dans les conditions actuelles, si les protéines responsables de l'interférence virale dans les plantes sont ou non des interférons. Il s'agirait, cependant, de substances vraisemblablement très voisines, sinon identiques, et dont les mécanismes d'action seraient analogues à ceux des interférons décelés chez les animaux. Aucun fait n'a pu encore contredire cette dernière hypothèse; les substances extraites par Loebenstein et Ross (1963), et Sela et Applebaum (1965) ne seraient en fait que des produits de dégradation de ces interférons. Les conclusions des observations de l'état d'interférence virale chez les plantes ne diffèrent de celles qui se rapportent à l'interférence virale chez les animaux, ce qui tend à démontrer que les principes inhibiteurs induits dans les plantes seraient des interférons ou des analogues d'interféron ("interféron-like"). Ces substances pourraient d'ailleurs agir simultanément avec les polyphénols, ce qui est très vraisemblable.

CONCLUSION

Cette courte étude a permis de confirmer les travaux de Loebenstein et Ross sur l'existence d'une résistance acquise dans les Tabacs (*Nicotiana tabacum* L., var. Samson NN).

Elle a aussi permis de mettre en évidence l'existence de différences entre trois souches du virus de la mosaïque du Tabac, tant du point de vue de la production de substance interférante que sur le plan de la sensibilité à cette substance.

Cette étude a conduit à vérifier que la production maximale d'inhibiteur est due au virus qui se multiplie à sa température optimale et que le virus qui possède la température optimale de développement la plus élevée, produit le moins d'inhibiteur. Cette dernière constatation en accord avec celle de Ruiz-Gomez et Isaacs, tend à démontrer la nature d'interféron de la substance inhibitrice induite par le VMT dans les Tabacs.

A N N E X E

Définition, production et mécanisme d'action de l'interféron.

1° - Définition.

Pour être considérés comme des interférons, les inhibiteurs doivent avoir, selon Lockart (1965), les propriétés suivantes:

- 1- l'inhibiteur doit être une protéine et doit être produit par les cellules traitées avec la substance inductrice;
- 2- l'effet antiviral ne doit pas résulter d'effets toxiques non spécifiques sur le métabolisme cellulaire;
- 3- l'interféron proposé doit inhiber la croissance des virus dans les cellules par l'intermédiaire d'un mécanisme intracellulaire mettant en jeu la synthèse simultanée de protéine et d'acide ribonucléique par les cellules;
- 4- l'inhibiteur doit être actif contre une gamme de virus non apparentés.

Ces propriétés ne sont pas suffisantes, mais aucune autre ne peut être présentement avancée sans restriction; ainsi en est-il de la spécificité de production d'interféron des cellules hôtes ou des conditions de stabilité des inhibiteurs à divers pH.

2° - Production.

Divers auteurs ont étudié les mécanismes de production de l'interféron par les virus. Ces problèmes n'ont cependant pas été totalement résolus et seuls des schémas hypothétiques ont été proposés. Il en est d'ailleurs de même pour ce qui concerne les mécanismes d'action de l'interféron.

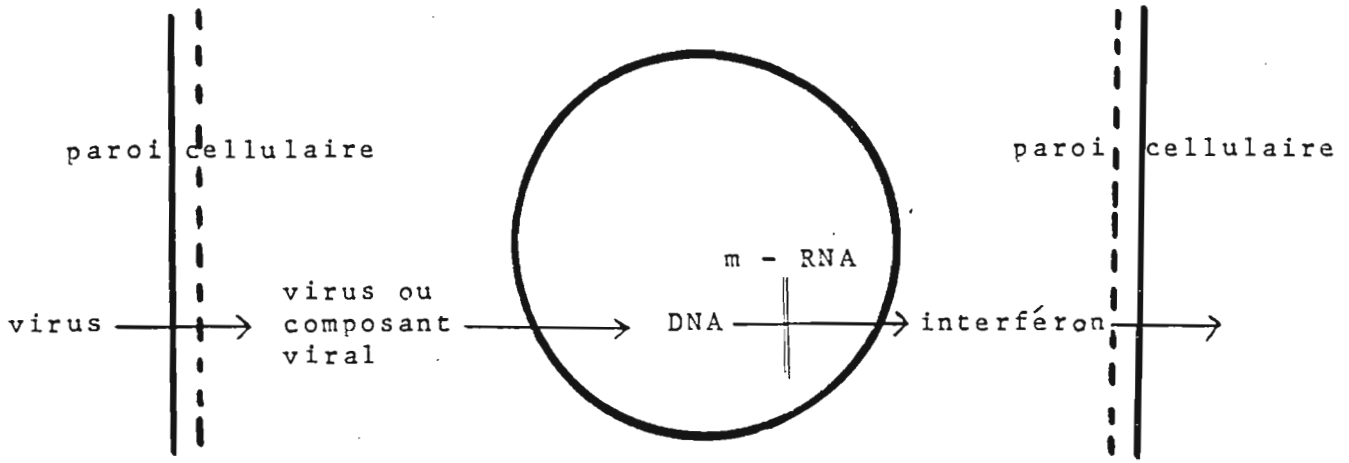
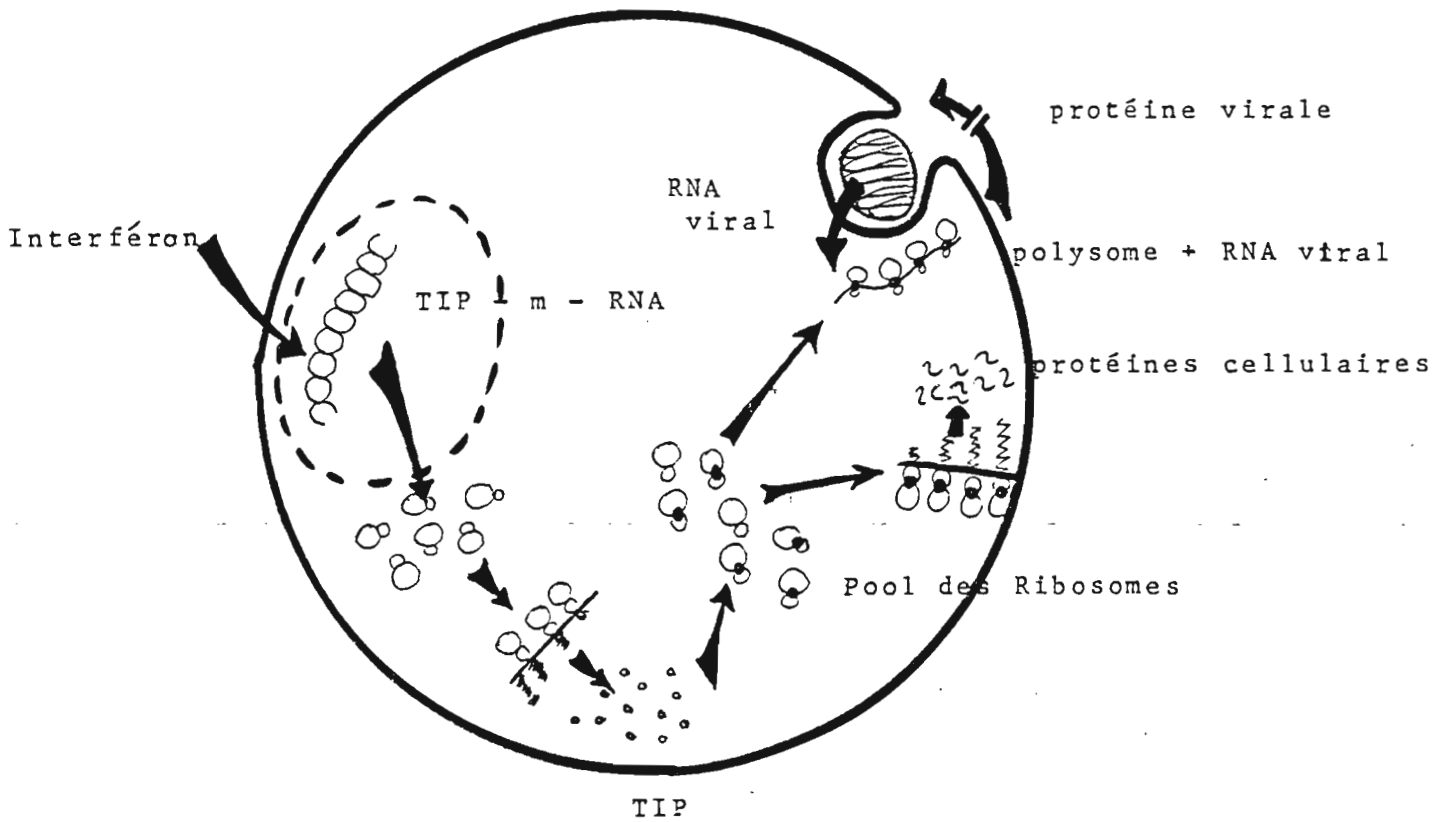


Schéma hypothétique de production d'interféron (Burke)



Modèle d'action possible de l'interféron (Marcus)

Burke (1966), s'appuyant sur les travaux de Heller, Wagner et Reich, résume les mécanismes de production d'interféron par les virus en trois étapes (voir schéma):

- 1^a invasion du virus, suivie de la décapsidation du virus et de la mise en liberté de l'inducteur de formation de l'interféron;
- 2- interaction de l'inducteur et du génome de la cellule hôte conduisant à un processus semblable à la dérégulation;
- 3- synthèse de RNA-messager de l'interféron qui entraîne la synthèse de l'interféron et de quelques autres protéines impliquées dans sa production.

3° - Mécanisme d'action.

Un modèle du mode d'action possible de l'interféron a été proposé par Marcus et ses collaborateurs (1966) (voir schéma). Une ou plusieurs molécules d'interféron agiraient pour "déréguler" un cistron de la cellule hôte, initiant la transcription du RNA-messager, le TIP-mRNA qui code pour la TIP (Translation Inhibitory Protein). Celle-ci est synthétisée et accumulée dans le cytoplasme où elle se lie aux ribosomes et forme des unités de ribosomes-TIP. Les polysomes composés de ribosomes-TIP et de m-RNA cellulaires sont traduits normalement; par contre les polysomes formés à partir de ribosomes -TIP et de RNA viral ne sont pas traduits, produisant un état d'interférence.

Dans le modèle proposé par Marcus et Salb, le RNA viral n'est plus répliqué dans les cellules complètement bloquées par l'interféron. Des considérations quantitatives, sur ce dernier point, suggèrent la possibilité qu'aux faibles concentrations d'interféron, ou plus exactement de TIP induite par l'interféron, quelques messagers viraux accrochent suffisamment de ribosomes normaux pour transcrire un segment significatif du génome viral. Des polysomes viraux composés de ribosomes normaux et de ribosomes inhibés par du TIP peuvent provoquer la synthèse limitée de certaines protéines spécifiques du virus, expliquant probablement les divers degrés de fonctionnement du génome viral dans les cellules traitées à l'interféron (Levy, 1964) et le fait que l'interférence est rarement absolue.

BIBLIOGRAPHIE

1. BENNETT C. W. (1951) - Advances in Virus Research. I, 39-67.
2. BURKE D. C. (1966) - Frontiers of Biology. 2, p55.
3. FARKAS G.L., KIRALY Z. et SOLYMOSY (1960) - Virology. 12, 408-421.
4. FOLIN O. et CIOCALTEU V. (1927) - J. Biol. Chem. . 73, 627-650.
5. GHOSH S.N. et GIFFORD (1965) - Virology. 27, 186-192.
6. GINOZA W., ATKINSON D.E. et WIDMAN S.G. (1954) - Science. 119, 269-272.
7. HIRTH L. (1958) - Thèse. Paris.
8. HOLMES F.O. (1930) - Amer. J. Bot. 17, 789- 805.
9. ISAACS A. (1963) - Advances in Virus Research. 10, 1-38.
10. KIKUCHI et YAMAGUCHI (1960) - Nature. 187, 1048- 1049.
11. KIRALY Z. et FARKAS G.L. (1958) - Phytopath. 34.
12. LEBEURIER G. et HIRTH L. (1966) - Path. et Biol. 14, 158-169.
13. LEVY H.B. (1964) - Virology. 22, 575-579.
14. LIMASSET P. et DARPOUX H. (1951) - Principes de path. végét. p334.
15. LOEBENSTEIN G. et ROSS A.F. (1963) - Virology. 20, 507-517.
16. LOEBENSTEIN G. (1960) - Nature. 185, 122-123.
17. LOCKART R.Z. (1960) - Frontiers of Biology. North Holland. 2, p14.
18. LOWRY O.H., ROSEBROUGH A. et LOWES FAN (1951) - J. Biol. Chem. 193, p265.
19. MARCUS P.I. et SALB J.M. (1966) - Virology, 30, 502-516.
20. MARTIN C. (1959) - I.N.R.A., Thèse.
21. PARISH C.L., ZAITLIN M. et SIEGEL A. (1959) - Virology. 26, 413-418.
22. PAVILLARD (1953) - Thèse. Paris, p.201.
23. PRICE W.C. (1935) - Phytopath. 25, 779-789.
24. ROSS A.F. (1959) - Phytopath. , 49, p549.
25. ROSS A.F. (1961a) - Virology. 14, 329-339.
26. ROSS A.F. (1961b) - Virology. 14, 340-358.
27. ROSS A.F. (1965) - Viruses of Plants, Wageningen, 127-150.
28. ROSS A.F. et BOZARTH R.F. - Phytopath., 50, p652.
29. RUIZ-GOMEZ J. et ISAACS A. (1963a) - Virology, 19, 1-7.
30. RUIZ-GOMEZ J. et ISAACS A. (1963b) - Virology, 19, 8-12.

31. SCHWARTZ D. (1963) - Méthodes Statistiques. Ed. Flammarion.
32. SELA I. et APPLEBAUM S.W. (1962) - Virology. 17, 543-548.
33. SELA I., HARPAZ I. et BIRK Y. (1965) - Virology. 25, 80-82.
34. STANLEY W. M. (1935) - Phytopath., 25, 899-921.
35. STEERE R.L. (1963) - Science, 140, 1089-1090.
36. TAKAHASHI W.N. et ISHII M. (1952) - Phytopath., 42, 690-691.
37. THORNBERRY H.H. (1935) - Phytopath., 25, 618-627.
38. WEINTRAUB M. et GILPATRICK J.D. (1952) - Science, 115, 701-702.
39. WEINTRAUB M. et KEMP W.G. (1961) - Virology. 13, 256-257.
40. WILLIAMS A.H. (1959) - Phenolis in Plants in Health and Disease.
41. YARWOOD C.E. (1952) - Phytopath., 42.
42. YARWOOD C.E. (1953) - Phytopath., 43, p490.