

## DÉTECTION ET PROPRIÉTÉS DE FORMES DU VIRUS DE LA MOSAÏQUE DU TABAC DÉPOURVUES D'ACIDE RIBONUCLÉIQUE ET NON INFECTIEUSES

par

R. JEENER, P. LEMOINE ET C. LAVAND'HOMME

*Laboratoire de Physiologie animale, Université de Bruxelles (Belgique)*

### INTRODUCTION

MARKHAM, MATTHEWS ET SMITH<sup>1</sup> ont signalé en 1948 l'existence dans des plantes infectées par le "turnip yellow mosaic virus" d'une protéine de propriétés immunologiques identiques à celles du virus, mais dépourvue d'acide ribonucléique (ARN) et non infectieuse. En 1952, deux d'entre nous<sup>2,3</sup> ont retrouvé un antigène non infectieux également dépourvu d'ARN dans des plantes infectées par le virus de la mosaïque du tabac (VMT). Le lien qui paraît donc exister entre le caractère infectieux des virus végétaux et la présence d'acide ribonucléique a pris un considérable intérêt depuis que l'acide désoxyribonucléique des phages apparaît comme jouant un rôle fondamental lors de l'infection des bactéries par ces virus<sup>4</sup>. D'autre part, les progrès rapides faits par nos connaissances sur la multiplication des phages montrent que celle-ci doit s'effectuer par des étapes successives au cours desquelles les constituants du virus s'édifient indépendamment les uns des autres. Peut-être les protéines apparentées immunologiquement au virus de la mosaïque du tabac, mais non infectieuses et dépourvues d'ARN, représentent-elles certaines de ces étapes dans le cas des virus végétaux.

Pendant que nous poursuivions nos recherches sur les antigènes non infectieux du virus de la mosaïque du tabac, divers travaux ont paru sur le même sujet<sup>5,6</sup>. Il nous a paru utile de rendre possible la comparaison de ces recherches avec les nôtres en décrivant aujourd'hui nos résultats avec plus de détails que nous ne l'avons fait jusqu'à présent<sup>2,3,7</sup>.

### MATÉRIEL ET TECHNIQUES

Le virus utilisé nous a été fourni par le Dr. BAWDEN. Il a été cultivé sur *Nicotiana tabacum*, var. White Barley, soit en plein air, soit en serre. Les extraits de plantes sont obtenus à partir de tissus frais ou congelés, par homogénéisation (12,000 tours/minute, pendant 2 minutes, app. Osterizer) dans deux fois le poids humide de solution physiologique de Chambers (KCl 5.2; NaCl 1.75; citrate Na 2.5 pour 1000 sol.) tamponnée à pH 7.2 par du phosphate *M*/200.

Le virus est isolé par la méthode de COMMONER<sup>8</sup> modifiée par l'intercalation d'une précipitation à pH 4.7 entre chacune des précipitations successives à pH 3.4.

Les centrifugations différentielles ont été réalisées à l'aide de la centrifugeuse Spinco, modèle L, rotor 40. Les mesures de mobilité électrophorétique sont faites dans la branche ascendante de l'appareil Perkin-Elmer, modèle 38, les diagrammes étant obtenus par la "scanning method" de LONGSWORTH. Le microscope électronique utilisé est l'appareil Philips; l'ombrage est obtenu avec le mélange or-manganèse 1/1. L'immunisation des lapins contre le VMT est provoquée par deux injections à 24 heures d'intervalle de 15 mg de virus, purifié par la technique de COMMONER, l'antisérum étant recueilli 2 à 3 semaines plus tard. Les précipités immunologiques sont obtenus et traités suivant

les indications de KABAT ET MAYER<sup>9</sup>, les dosages d'azote étant effectués à l'aide de l'appareil de MARKHAM.

Les antigènes solubles sont détectés par la technique de précipitation spécifique de OUDIN en gel d'agar contenant l'antisérum<sup>10</sup>.

L'acide ribonucléique est dosé spectrophotométriquement après extraction, dans l'acide perchlorique 10% froid, du virus préalablement précipité par l'acide trichloracétique, et traité par l'alcool et l'éther.

La comparaison du caractère infectieux du virus et des antigènes solubles est faite par application des solutions sur *Nicotiana glutinosa* suivant une méthode qui sera décrite plus loin.

## RÉSULTATS

### *Détection des antigènes solubles accompagnant le virus de la mosaïque du tabac*

La totalité des protéines susceptibles de se combiner avec les anticorps obtenus par l'injection au lapin de VMT se trouve dans la fraction des extraits précipitée à pH 3.4, après élimination des protéines précipitant à pH 4.7. La recherche des antigènes solubles peut donc être effectuée sur cette fraction seulement. Les divers tests destinés à la détection de ces antigènes ont été appliqués à l'étude de plantes normales servant de témoins, de plantes infectées alors qu'elles ne présentaient qu'une rosette de jeunes feuilles et cultivées à l'extérieur pendant 2 à 3 mois (infection systémique), de feuilles de divers âges sur lesquelles avait été appliquée une solution de virus 10 à 20 jours auparavant (infection directe).

### *Examen immunologique (méthode de OUDIN)*

La partie inférieure des tubes étant occupée par de l'antisérum étendu d'un volume égal de sérum normal ou, à titre de témoin, par du sérum normal seulement, tous deux gélosés, la partie supérieure est remplie d'une solution à 2% des protéines précipitées à pH 3.4 et redissoutes à pH 7 dans la solution de Chambers. Quelle que soit l'origine des antigènes utilisés, aucune réaction n'apparaît au contact du sérum normal. De même, des protéines provenant de plantes non infectées ne réagissent pas avec l'antisérum.

Dans le cas d'une préparation de virus provenant de feuilles ayant subi une infection directe, il n'apparaît jamais qu'une zone de précipitation minuscule dans l'angle formé par la surface concave du gel d'agar et la paroi du tube. Cette zone de précipitation ne manifeste par la suite aucune extension appréciable (Figs. 1, 2).

Si la préparation de virus provient de feuilles ayant subi une infection systémique, une zone de précipitation importante apparaît au contraire et se déplace rapidement dans le gel d'agar. Cette zone de précipitation comporte deux bandes nettement distinctes par leur opacité et la vitesse inégale de leur déplacement (Figs. 1, 2).

La conclusion de ces expériences paraît être que les feuilles où une infection systémique s'est développée contiennent deux antigènes en plus du virus lui-même. Dans les feuilles ayant subi une infection directe, au contraire, le virus paraît seul présent.

### *Examen par électrophorèse*

Les solutions ayant servi aux examens immunologiques précédents sont soumises à l'électrophorèse après dilution convenable et dialyse contre un tampon borate  $M/10$  de pH 8.2. Ainsi que le montrent les diagrammes ci-contre (Fig. 3), la solution préparée à partir de feuilles ayant subi une infection directe contient un seul constituant, le virus classique, de mobilité  $11 \cdot 10^{-5}$  cm<sup>2</sup>/volt  $\times$  sec. Les solutions provenant de plantes ayant

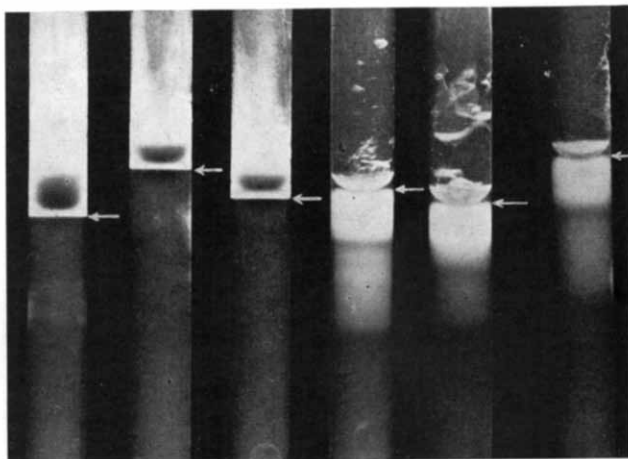


Fig. 1. Zones de précipitation provoquées par la diffusion du VMT et de ses antigènes dans de l'anti-sérum gélosé. Les flèches indiquent la position du sommet du ménisque formant la limite entre l'antisérum et la solution d'antigènes. Tubes de gauche: virus provenant de feuilles infectées directement. Tubes de droite: virus et antigènes associés provenant de feuilles ayant développé une infection systémique.

subi une infection systémique en contiennent au contraire trois: le virus présentant la mobilité indiquée ci-dessus, et deux constituants supplémentaires respectivement de mobilités  $10.3 \cdot 10^{-5}$  et  $5.9 \cdot 10^{-5}$   $\text{cm}^2/\text{volt} \times \text{sec}$ .

Les résultats obtenus par électrophorèse confirment avec la plus grande netteté ceux obtenus par la technique immunologique de OUDIN. Dans certaines conditions, la plante de tabac contient donc, outre le virus, deux constituants anormaux apparaissant dans la même fraction que le virus lorsque celui-ci est purifié par la méthode de COMMONER. Comme ces constituants sont absents dans le cas d'infections directes et présents dans le cas d'infections systémiques, alors que la technique de préparation de la fraction étudiée est toujours la même, nous pouvons en conclure que nos deux antigènes supplémentaires ne peuvent être de simples artefacts. Leur nature, les conditions de leur apparition et leur rôle méritent donc d'être étudiés.

#### *Préparation en masse des antigènes solubles*

La rapidité avec laquelle les antigènes solubles de la plante en infection systémique pénètrent dans les gels d'agar pour s'y combiner avec l'anticorps correspondant, opposée à la migration quasiment nulle qu'y effectue le virus lui-même, suggère que les antigènes solubles ont un coefficient de diffusion notablement plus grand et par conséquent une taille beaucoup plus petite que le virus. La centrifugation différentielle paraît

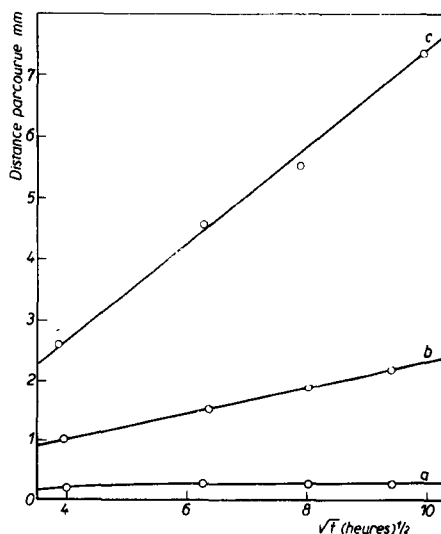


Fig. 2. Déplacements dans l'antisérum gélosé des fronts de précipitation correspondant: (a) au virus, (b) à l'antigène à faible vitesse de migration, (c) à l'antigène à grande vitesse de migration. (a: extrait de feuilles infectées directement; b et c: extrait de feuilles en infection systémique).

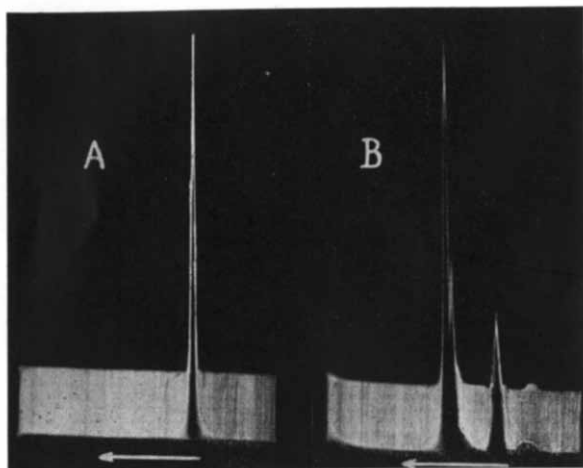


Fig. 3. Diagrammes d'électrophorèse de la fraction des protéines isolée à pH 3.4: A, à partir de feuilles infectées directement; B, à partir de feuilles ayant subi une infection systémique (les flèches indiquent le sens de la migration).

r.p.m. et 40,000 r.p.m. Chacun des liquides surnageants obtenus est appliqué sur les 5 plus jeunes feuilles de 6 plantes de *Nicotiana glutinosa*, et le nombre des lésions locales produites est rapporté à l'unité de surface de feuille. Simultanément sont appliquées, sur des lots de feuilles semblables, une série de dilutions de la solution de départ. Le nombre de lésions obtenues pour chaque dilution est porté sur un graphique de référence semi-logarithmique. Pour déterminer la proportion de particules de virus encore présentes en solution après les diverses centrifugations, il suffira donc de chercher, à l'aide de ce graphique, la dilution pour laquelle le même nombre de taches de nécrose est observé. Le résultat obtenu est qu'une centrifugation à 28,000 r.p.m. d'une heure réduit le nombre de particules infectieuses à 1.2% de sa valeur initiale, une centrifugation à 40,000 r.p.m. d'une heure à 0.03% ou moins.

Parallèlement à ces mesures d'infectivité, on détermine la teneur en azote protéique du précipité obtenu par l'adjonction d'un léger excès d'antisérum à un volume connu du liquide surnageant de chaque centrifugation. La réduction de la quantité d'antigène ayant les caractères immunologiques du VMT n'est nullement proportionnelle à la réduction du nombre des particules infectieuses. Une centrifugation à 28,000 r.p.m. la réduit en effet à 22% approximativement de sa valeur initiale, et une centrifugation à 40,000 r.p.m. à 18% de cette même valeur, alors que les chiffres correspondants pour le nombre de particules infectieuses sont respectivement 1.2 et 0.03%.

Pratiquement, les antigènes restant dans le liquide surnageant après une centrifugation d'une heure à 28,000 r.p.m. sont très peu infectieux; ceux, presque aussi abondants, obtenus après une heure de centrifugation à 40,000 r.p.m. ne le sont plus du tout.

Le matériel ainsi séparé peut donc servir de point de départ à un essai de purification d'antigènes dépourvus d'infectivité.

L'opération effectuée est la suivante. Après que la fraction précipitable à pH 4.7, dépourvue de toute propriété immunologique la rapprochant du VMT, ait été éliminée, la fraction précipitée à pH 3.4 est recueillie et redissoute à pH 7. Après trois cycles de précipitations semblables, le précipité obtenu à pH 4.7 devient insignifiant et le précipité

sait donc devoir être une bonne méthode de séparation des antigènes et du virus.

Les feuilles jeunes de plantes manifestant une infection systémique depuis deux mois sont conservées à basse température ( $-30^{\circ}\text{C}$ ), rapidement décongelées et dispersées mécaniquement dans deux fois leur poids de solution de CHAMBERS (2 minutes à  $0^{\circ}\text{C}$ ). La suspension obtenue est passée au travers de soie à bluter à mailles serrées et centrifugée à 10,000 r.p.m. pendant 10 minutes pour en éliminer les plastes et les grosses particules. Cette solution de départ est alors centrifugée pendant des temps variables à 28,000

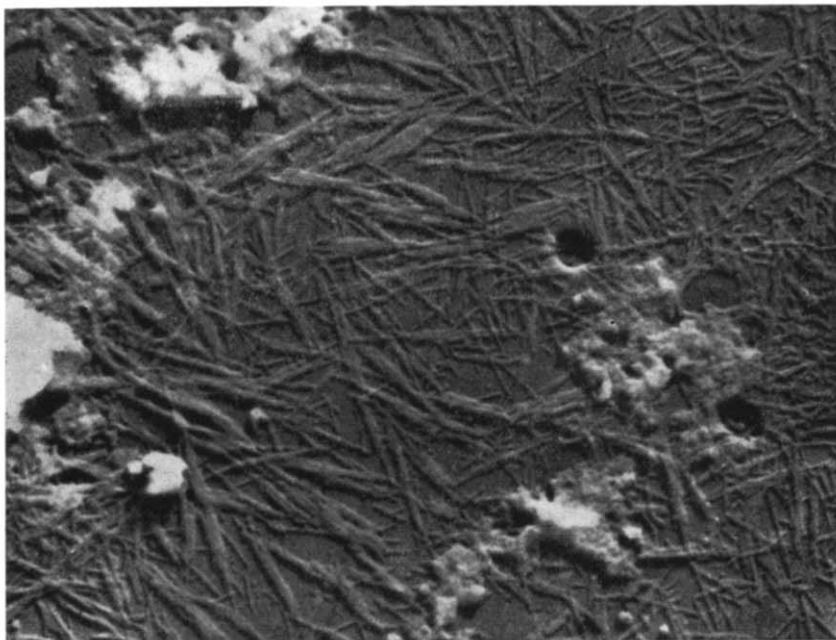


Fig. 4. Antigènes non infectieux "cristallisés" à pH 3.4 — Stade de la purification où de petites quantités d'impuretés donnant un précipité amorphe sont encore présentes. M. E. gross. 16,000 fois.

final à pH 3.4 est examiné au microscope à fond noir. Lorsqu'il est formé exclusivement de fines aiguilles d'aspect identique à celles formées par le virus au même pH (Fig. 4), la purification est jugée suffisante. La quantité de substance recueillie représente 20% environ du poids du virus contenu dans le même volume d'extrait initial.

Une méthode de préparation de la même fraction fournissant des quantités de produits plus grandes consiste à prendre comme point de départ, non pas un extrait dilué de plantes infectées comme ci-dessus, mais une solution à 1% de l'ensemble des constituants isolés par la technique de COMMONER, modifiée comme nous l'avons indiqué précédemment. De grandes quantités de cette fraction complexe, contenant à la fois le virus et ses antigènes, peuvent être préparées rapidement si l'on remplace au cours de la préparation la centrifugeuse ordinaire par une centrifugeuse Sharples. La solution à 1% du produit obtenu est soumise au même traitement que celui indiqué ci-dessus pour l'extrait de plante. Signalons toutefois que le produit final est un peu moins satisfaisant que celui donné par la première méthode. Les cristaux en aiguilles récoltés se montrent en effet toujours accompagnés de petites quantités d'un précipité granuleux que nous n'avons pu éliminer.

#### *Examen des propriétés des antigènes solubles isolés*

##### *Identification par électrophorèse — Caractères immunologiques — Tests d'infectivité*

L'examen par électrophorèse montre que la technique de séparation du virus et de ses antigènes est efficace. La solution d'antigènes obtenue ne contient en effet plus que les constituants de mobilités  $10.3 \cdot 10^{-5}$  et  $5.9 \cdot 10^{-5}$  cm<sup>2</sup>/volt  $\times$  sec (Fig. 5). Il est facile de montrer que le constituant le plus rapide est bien différent du virus de mobilité très

voisine ( $11 \cdot 10^{-5} \text{ cm}^2 \text{ volt} \times \text{sec}$ ). En effet, si nous ajoutons à la solution d'antigènes purifiés du virus provenant de feuilles en infection directe, les trois constituants décrits au début de ce travail manifestent leur présence (Fig. 5).

La présence dans la solution d'antigènes purifiés de deux constituants immunologiquement distincts peut d'autre part être démontrée par la technique de Oudin, deux fronts de précipitation apparaissant dans le gel d'agar contenant l'antisérum.

Enfin l'absence de virus infectieux dans la préparation d'antigènes peut être contrôlée par l'application de solutions sur *Nicotiana glutinosa*. Le nombre de taches de nécrose ainsi provoquées est en effet 2,000 fois plus petit que le nombre de taches qui résulterait d'une application de virus à la même concentration.

L'examen électrophorétique indique à lui seul que la solution étudiée ne contient pas de protéines normales en quantités appréciables. Cette conclusion peut être confirmée

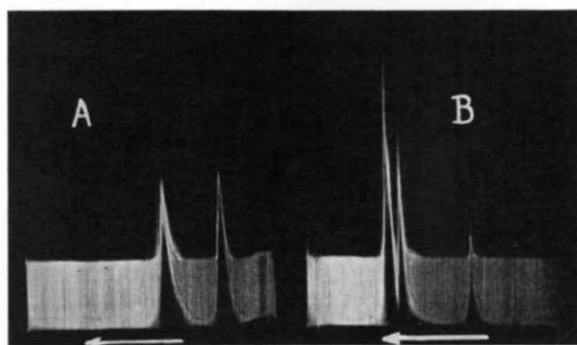


Fig. 5. Diagrammes d'électrophorèses (A) de la solution d'antigènes purifiés, (B) de cette même solution à laquelle a été ajouté du VMT provenant de feuilles infectées directement.

comme suit. Des solutions de même concentration d'antigènes et de virus sont traitées par un même volume d'antisérum, choisi de manière à ce que l'anticorps soit présent en excès dans les deux cas. La quantité d'anticorps non utilisée est alors déterminée par l'adjonction d'un excès de virus et le dosage du N protéique du précipité. Cette expérience simple permet de constater que les antigènes étudiés fixent une quantité d'anticorps légèrement supérieure à celle fixée par le même poids de virus. Les antigènes et le virus sont donc immunologiquement proches et il est peu probable que la préparation d'antigènes contienne beaucoup de matériel normal, immunologiquement inactif.

D'autre part, on constate que de l'antisérum traité par un excès de la solution d'antigènes donne encore un léger précipité avec le VMT. Si la similitude sérologique des antigènes et du virus est grande, nous ne pouvons donc la considérer comme parfaite, au moins en ce qui concerne l'un des constituants de la solution d'antigènes étudiée. Qu'il en soit bien ainsi est d'ailleurs démontré par l'apparition de deux fronts de précipitation lors de la diffusion des antigènes dans l'antisérum gélosé, l'un de ces fronts au moins correspondant à une protéine immunologiquement distincte du virus.

#### *Constitution chimique*

Nous nous sommes limités à la recherche de l'acide ribonucléique par extraction à l'aide d'acide perchlorique 10% à 2° C, suivie d'une étude spectrophotométrique de l'extract. La méthode est appliquée simultanément à du virus et au mélange des deux

antigènes non infectieux isolés. Comme le montre le graphique ci-contre (Fig. 6), le spectre d'absorption de l'extrait perchlorique du virus est caractéristique de l'acide ribonucléique, ou plus exactement du mélange de nucléotides pyrimidiques et de purines résultant de sa dégradation par l'acide perchlorique. Une légère déformation du spectre témoigne de la présence d'impuretés, mais celles-ci sont assez peu abondantes pour que

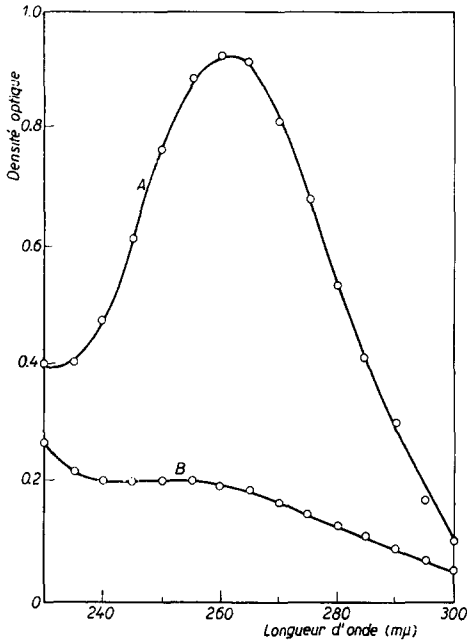


Fig. 6. Spectres d'absorption d'extraits perchloriques de mêmes poids (A) de VMT et (B) d'antigènes non infectieux.

le maximum d'absorption observé puisse nous permettre d'évaluer à 5% du poids sec environ la teneur du virus en acide ribonucléique. Le spectre d'absorption donné par l'extrait perchlorique d'un même poids d'antigènes semble indiquer à première vue que les antigènes non infectieux sont dépourvus d'acide ribonucléique. Une légère déformation du spectre dans la région du maximum d'absorption de l'acide ribonucléique pourrait cependant traduire la présence de traces de cette substance. A titre d'indication, signalons que l'extrait perchlorique d'ovalbumine contenant 0.1% du poids sec d'acide ribonucléique présenterait un spectre assez analogue.

Un essai de dosage de l'acide ribonucléique des antigènes par la méthode à l'orcine fait apparaître une très légère coloration, mais le spectre d'absorption de la solution colorée est considérablement déformé par les réactions données par des impuretés. Le même essai, pratiqué sur le virus, fournit une réaction très franche, à spectre d'absorption caractéristique et utilisable pour le dosage.

Des tentatives analogues de mise en évidence de traces d'acide ribonucléique dans les solutions d'antigènes ont été effectuées sur des précipités des antigènes par un antisérum dans l'espoir que seraient ainsi éliminées certaines impuretés gênantes. Les résultats obtenus ont été cependant les mêmes.

Nous concluons donc que nos solutions d'antigènes purifiés étaient exemptes d'acide ribonucléique ou n'en contenaient que des traces.

#### *Dimensions — Etats d'agréation*

Les solutions d'antigènes purifiés, à pH 7 et à la concentration de 0.15%, montrent lors d'une centrifugation d'analyse un seul constituant nettement visible, de vitesse de sédimentation très voisine de celle du virus. Une centrifugation d'une heure à l'aide de la centrifugeuse Spinco préparative tournant à 28,000 r.p.m. sépare un culot important, et la concentration dans le liquide s'abaisse à 0.03%. La plus grande partie du matériel purifié est donc constituée de particules de grandes dimensions. Ces particules sont de forme allongée puisque, à concentrations égales, les solutions d'antigènes purifiés et les solutions de virus montrent une biréfringence de flux très comparable lorsqu'on les fait s'écouler par une fente étroite entre deux lames de polaroïde convenablement orientées. L'examen au microscope électronique confirme cette conclusion en montrant en même temps l'extrême hétérogénéité de ces particules (Fig. 7). Un grand

nombre d'entre elles montrent les dimensions des particules classiques du virus ( $280\text{ m}\mu$ ), mais il en existe beaucoup qui, tout en étant de même largeur, sont de longueurs variant entre  $130\text{ m}\mu$  et  $35\text{ m}\mu$ . De plus, le fond de la préparation est granuleux et fait soupçonner la présence de particules plus petites encore, bien qu'il soit difficile de les distinguer d'artefacts d'aspect comparable.

L'existence de ces particules de grandes dimensions dans les solutions d'antigènes purifiés paraît en contradiction avec le fait que les antigènes non infectieux se séparent si aisément des particules de virus par centrifugation différentielle des extraits de plantes, et se retrouvent en abondance dans le liquide surnageant de centrifugation de ces extraits obtenu à  $40,000\text{ r.p.m.}$  après une heure et même après plusieurs heures. L'explication la plus simple de cette apparente contradiction est que ces particules sont formées, au cours de la purification, par l'agrégation de particules plus petites.



Fig. 7. Antigènes non infectieux purifiés. M. E. gross. 47,000 fois.

Une démonstration directe de la facilité avec laquelle une pareille agrégation se produit résulte de l'observation suivante. Le liquide surnageant provenant d'une centrifugation à  $28,000\text{ r.p.m.}$  d'une solution concentrée d'antigènes purifiés contient encore  $0.03\%$  de protéines. Examiné au microscope électronique, il se montre exempt de toute particule qui aurait les dimensions d'une particule de virus ou d'un fragment de particule de même largeur que celle-ci. Mais il suffit qu'il soit soumis à une congélation momentanée, pour que d'innombrables particules, plus courtes que celles du virus, mais de même largeur, y apparaissent.

Ces observations nous montrent combien les protéines constituant les antigènes solubles sont proches par leur structure des protéines du virus. Le fait qu'elles s'agrègent aussi aisément en particules allongées nous aide de plus à comprendre qu'elles puissent donner naissance à pH 3.4 à des cristaux en aiguilles de forme comparable à ceux du virus lui-même.

D'autre part, cette agrégation des particules d'antigènes au cours de la purification nous oblige à tenter d'évaluer leurs dimensions en étudiant leur vitesse de sédimentation



au sein de l'extrait initial. Les difficultés de semblable étude sont bien connues et MARKHAM a récemment contribué à nous les faire comprendre clairement<sup>11</sup>. A titre de simple indication, nous résumerons cependant nos essais dans cette voie.

Des extraits de plantes infectées sont débarrassés des particules de virus par une centrifugation préalable à 40,000 r.p.m. Ces extraits sont ensuite soumis à des centrifugations de durées variables à la même vitesse. Les liquides surnageants, séparés très aisément des culots à cause de l'extrême cohérence de ceux-ci, sont traités par un léger excès d'antisérum, et l'azote des précipités obtenus est dosé. On constatera ainsi, par exemple, qu'un aliquot du liquide surnageant obtenu après une heure de centrifugation fournit un précipité contenant 90  $\gamma$  de N, alors que le même aliquot en fournit un contenant 50  $\gamma$  après 4 heures de centrifugation. Rappelons, à titre de comparaison, qu'une centrifugation de 30 minutes, à 28,000 r.p.m. seulement, suffit à la sédimentation de la quasi totalité des particules du virus.

Un calcul basé sur des données semblables et fait dans l'hypothèse d'une absence totale de phénomènes de convection permettrait d'attribuer aux particules d'antigènes un diamètre de 12  $m\mu$ , à supposer qu'elles soient sphériques et d'une densité très proche de celle du virus. Que la méthode suivie puisse conduire à des valeurs approchées de la constante de sédimentation a été contrôlé par des expériences effectuées dans le même milieu de suspension et à la même concentration sur des particules de virus pour lesquelles cette constante est bien connue. Cependant nous ne voulons tirer de la valeur obtenue que la preuve de la très faible dimension des particules d'antigène comparée à celle du virus ( $15 \times 270 m\mu$ ). Notons enfin que la démonstration, donnée par électrophorèse et immunologiquement, de l'hétérogénéité de nos préparations d'antigènes nous oblige à considérer que les particules étudiées pourraient appartenir à deux catégories de tailles différentes.

Une tout autre méthode, basée sur l'étude de la vitesse de déplacement des zones de précipitations données par un antigène dans des gels d'agar contenant de l'antisérum, semble pouvoir nous fournir une confirmation de l'idée que les particules d'antigènes sont beaucoup plus petites que celles du virus. BECKER ET MUNOZ<sup>12</sup> ont publié un travail préliminaire à ce sujet.

Soit  $D_1$ : constante de diffusion de l'antigène

$D_2$ : constante de diffusion de l'anticorps

$x(t)$ : déplacement du plan de précipitation depuis sa position initiale, après un temps  $t$

$C$ : rapport des concentrations de l'antigène et de l'anticorps utilisés pour faire l'expérience de diffusion, divisé par le rapport des mêmes concentrations dans le précipité immunologique

$$R = \frac{x^2(t)}{t}$$

La théorie élémentaire des phénomènes étudiés<sup>12</sup> fournit la formule

$$D_1 = \frac{0.4343}{4} \frac{dR}{d\log_{10}C} \quad (1)$$

qui est valable lorsque  $C$  est grand et l'influence de la diffusion de l'anticorps négligeable.

Comme aucune de ces deux conditions ne semblait parfaitement remplie dans nos

expériences, nous avons étendu la théorie de manière à obtenir une formule valable pour toute valeur de  $C$  et de  $D_2$ . Pour cela nous avons résolu exactement les équations de diffusion de l'antigène et de l'anticorps en supposant le cylindre d'agar infiniment long et la concentration de l'antigène à la surface supérieure de l'agar constante pendant toute l'expérience. La solution du problème peut être mise sous la forme

$$C^* = \frac{C}{f_2\left(\frac{R}{D_2}\right)} = f_1\left(\frac{R}{D_1}\right) \quad (2)$$

$\frac{R}{D_2}$	0.5	2	8	18	32	$\infty$
$f_2\left(\frac{R}{D_2}\right)$	2.28	1.53	1.19	1.10	1.05	1

Comme le montre la formule (2), nous pouvons tenir compte de la diffusion de l'anticorps en divisant  $C$  par une fonction  $f_2$  de  $R$  et  $D_2$ . Il est donc nécessaire de connaître la constante de diffusion  $D_x$  de l'anticorps pour pouvoir appliquer cette correction. Nous aurons alors

$$D_1 = \frac{0.4343}{A} \frac{dR}{d \log_{10} C^*} \quad (3)$$

Cette formule nous permet de calculer  $D_1$  à partir des résultats d'une série d'expériences faites avec des valeurs différentes de  $C^*$ , en utilisant la valeur de  $A$  qui correspond à  $d \log R / d \log C^*$  obtenu à l'aide des mêmes résultats expérimentaux. En appliquant cette méthode de calcul aux résultats d'une expérience dans laquelle une même concentration d'antigène est utilisée, la concentration d'anticorps étant modifiée

TABLEAU I

$C^*$	$\frac{R}{D_1}$	$A = \frac{d(R/D_1)}{d \log_{10} C^*}$	$\frac{d \log R}{d \log C^*}$
1.41	2	1.48	0.74
4.07	4	2.28	0.57
17.7	8	3.07	0.38
60.8	12	3.38	0.28
339	18	3.50	0.20
1755	24	3.69	0.15
15,000	32	3.76	0.12
$\infty$	$\infty$	4	0

par la dilution de l'antisérum avec du sérum normal (Tableau II), nous avons obtenu  $D \sim 0.15 \cdot 10^{-6} \text{ cm}^2 \text{ sec}^{-1}$  comme constante de diffusion de l'antigène se déplaçant le plus rapidement dans l'agar (nous avons supposé  $D_2 = 0.4 \cdot 10^{-6} \text{ cm}^2 \text{ sec}^{-1}$ ). Ce qui correspondrait à une masse moléculaire de l'ordre de 3,000,000 si les particules considérées

sont sphériques. Il s'agit encore une fois d'une valeur très approximative. Remarquons de plus que les conditions de l'expérience n'excluent nullement que les particules étudiées résultent de l'agrégation de particules plus petites.

TABLEAU II

<i>Durée de la diffusion</i>	<i>Distances parcourues par le front de précipitation en mm</i>		
	<i>conc. sol. anticorps 1</i>	<i>conc. sol. anticorps 0.5</i>	<i>conc. sol. anticorps 0.25</i>
9 h, 30 min	2.83	3.33	
	2.67	3.50	
	2.50	3.50	
30 h	5.00	6.33	7.50
	5.00	6.33	8.50
	5.33	6.33	7.50
77 h	8.33	10.17	11.83
	8.67	10.33	11.83
	8.67	10.33	12.00
124 h	11.17	13.50	16.00
	11.83	13.17	16.17
	11.00	12.50	14.00

## DISCUSSION

Depuis la parution des notes préliminaires<sup>2, 3, 7</sup> dont ce travail est le développement, divers auteurs ont étudié les antigènes solubles du virus de la mosaïque du tabac. Les résultats récents de COMMONER et de ses collaborateurs<sup>6</sup> se superposent sur beaucoup de points aux nôtres et ont été obtenus d'ailleurs par les mêmes méthodes. Une confirmation plus frappante de nos résultats peut être trouvée dans les travaux publiés par TAKAHASHI ET ISHII<sup>5</sup>. Ces travaux reposent en effet sur l'emploi d'une technique d'isolement des antigènes solubles entièrement différente. Il nous paraît infiniment probable que les trois groupes de chercheurs se sont trouvés en présence du même matériel protéique.

Cependant les conditions où les antigènes solubles sont présents diffèrent nettement suivant les travaux considérés.

Suivant TAKAHASHI<sup>5</sup>, les antigènes solubles peuvent être détectés dans des feuilles, ayant subi une infection directe, 3 jours après l'infection; leur quantité s'accroît jusqu'au 7<sup>e</sup> jour, puis reste constante.

Suivant COMMONER<sup>6</sup>, ils sont abondants dans les feuilles ayant subi une infection systémique. En infection directe, ils apparaissent 9 jours après l'infection seulement, c'est à dire bien après le virus lui-même et continuent à croître en quantité jusqu'à un moment où la vitesse de croissance du virus a déjà beaucoup diminué.

Ainsi que nous l'avons signalé antérieurement, nous les avons trouvés uniquement dans des plantes ayant subi une infection systémique depuis 2 ou 3 mois. Malgré une recherche attentive, les feuilles infectées directement, laissées en place ou cultivées sur liquide physiologique, ne nous en ont jamais révélé la moindre trace.

La discordance entre les résultats de TAKAHASHI et ceux de COMMONER pourraient s'expliquer par les conditions d'extraction et de purification très différentes utilisées par

ces auteurs; ce qui sépare nos résultats de ceux de COMMONER échappe à pareille explication puisque dans ces deux cas des méthodes de détection entièrement semblables ont été utilisées. Force est donc de conclure que la présence ou l'absence des antigènes solubles est sans lien nécessaire avec le seul développement du virus, mais dépend également de l'état physiologique des plantes. Nous devons tenir compte de cette constatation si nous essayons d'imaginer le rôle des antigènes solubles ou les causes qui les font apparaître.

Discuter ce problème exige que nous examinions ce qu'a révélé le virus de la mosaïque du tabac à la lumière de tout ce que d'autres virus ont jusqu'à présent montré d'analogue.

Remarquons d'abord que la présence dans une plante de navet ou de chou chinois infectée par un autre virus de végétaux, le "turnip yellow mosaic virus", de protéines de même caractéristique immunologique que le virus, mais non infectieuses et dépourvues d'ARN a déjà été signalée et commentée à plusieurs reprises par MARKHAM<sup>1, 11</sup>. Nous avons retrouvé cette protéine au cours de nombreuses expériences et profité des facilités particulières offertes par ce matériel pour étudier la vitesse d'incorporation d'acides aminés marqués par le <sup>14</sup>C dans le virus et l'antigène non infectieux croissant côte à côte dans une même feuille<sup>13</sup>. Après des temps d'incorporation très courts par rapport au temps de génération du virus, la radioactivité acquise par l'antigène s'est montrée plusieurs fois supérieure à celle acquise par le virus. La conclusion à tirer de ce résultat nous paraît être que l'antigène non infectieux ne peut être un produit de dégradation du virus, par perte du ARN notamment, puisque s'il en était ainsi, sa radioactivité spécifique devrait être plus petite que celle du virus. D'autre part, la radioactivité plus grande de l'antigène non infectieux cadre avec l'hypothèse qu'il pourrait être un précurseur du virus, sans en fournir toutefois la démonstration.

Si des faits de ce genre peuvent être également recueillis dans le cas des antigènes non infectieux du VMT et prennent ainsi un caractère général, nous serions, semble-t-il, amenés à conclure que la portion protéique des virus végétaux est synthétisée séparément de la portion nucléique, et que les deux constituants du virus ne se trouvent réunis qu'au moment où les particules, ayant achevé leur évolution, deviennent infectieuses. Une pareille représentation des faits pourrait encore être précisée si nous adoptions l'idée récemment exprimée par WATSON<sup>14</sup> que la particule du virus de la mosaïque du tabac est le résultat de la cristallisation de petites unités protéiques d'un poids moléculaire de 35,000 en une spirale entourant un axe occupé par l'acide ribonucléique. Rappelons que, suivant MARKHAM<sup>11</sup>, l'acide ribonucléique du turnip yellow mosaic virus est de même enfermé dans une enveloppe protéique. Semblable image ferait des antigènes solubles du virus de la mosaïque du tabac les unités protéiques postulées par WATSON. Nous avons vu d'ailleurs avec quelle facilité elles s'agrègent en particules allongées ayant l'allure des particules du virus. Notons de plus qu'un des antigènes solubles dépourvus d'ARN possède une mobilité électrophorétique très voisine de celle du virus, ce qui fait supposer que l'acide ribonucléique du virus n'est pas disposé à sa surface.

Il est à peine nécessaire de faire remarquer combien cette conception nous rapproche de celle actuellement en faveur dans le cas des bactériophages. Là également, des particules protéiques dépourvues d'acide nucléique semblent être synthétisées et n'acquérir leur infectivité que par l'union de ce constituant protéique avec l'acide désoxyribonucléique spécifique venu se disposer à l'intérieur de la gaine protéique<sup>15</sup>.

Mais considérer les antigènes solubles comme des précurseurs du virus rend difficile de comprendre qu'ils apparaissent dans la feuille infectée après celui-ci et s'accumulent

dans des feuilles en infection systémique très avancée. Une hypothèse supplémentaire est nécessaire: au début du développement du virus, la synthèse de la portion protéique et celle de la portion nucléique se déroulent harmonieusement et les deux précurseurs s'unissent au fur et à mesure de leur formation; lorsque le métabolisme de la cellule hôte s'altère du fait de l'accumulation du virus, la synthèse de la portion protéique l'emporte sur celle de la portion nucléique et l'accumulation de protéines non infectieuses se manifeste.

Une dernière question mérite un examen rapide. Ainsi que toutes les recherches portant sur les antigènes solubles du VMT le montrent, ceux-ci sont au nombre de deux, peut-être même de trois. La spécificité immunologique de l'un d'entre eux au moins est nettement distincte de celle du virus, comme le montre l'étude des figures de précipitation obtenues en gel d'agar. Cette multiplicité des antigènes solubles pourrait s'expliquer dans le cadre de l'hypothèse présentée ci-dessus par le fait que la synthèse du constituant protéique du virus comporte plusieurs étapes au cours desquelles des remaniements de sa structure s'opèrent, ou encore par l'existence au sein d'une même particule de virus de plusieurs protéines. Rien ne nous permet à l'heure actuelle de choisir entre ces deux interprétations.

#### REMERCIEMENTS

Diverses personnes nous ont apporté une aide généreuse au cours de ce travail: M. F. C. BAWDEN en nous fournissant une souche de virus, M. M. FLORKIN, M. J. WIAME et plus particulièrement leurs collaborateurs M. CH. GRÉGOIRE et Madame BOUILLON dans l'exécution de photographies au microscope électronique, M. V. DESREUX lors d'une étude à l'ultracentrifugeuse d'analyse. Nous adressons à toutes nos plus sincères remerciements. Signalons enfin que le calcul de la constante de diffusion des antigènes d'après les données fournies par des expériences de précipitation en gels d'agar enfermant de l'antisérum a été conçu par M. J. JEENER qui nous a ainsi apporté une collaboration dont nous lui savons beaucoup de gré.

#### RÉSUMÉ

Les plantes de tabac dans lesquelles s'est développée une infection systémique due au virus de la mosaïque contiennent deux protéines immunologiquement proches du virus, non infectieuses et dépourvues d'acide ribonucléique. Ces deux protéines diffèrent entre elles et diffèrent du virus par leur mobilité électrophorétique. De très petites dimensions, elles s'agrègent aisément en particules de même forme que celles du virus et, à pH 3.4, en fines aiguilles analogues aux "cristaux" du virus. Ces deux protéines sont entièrement absentes dans les feuilles où du virus s'est développé à la suite d'une infection directe. Une hypothèse sur leur rôle dans la multiplication du virus et les conditions de leur apparition est formulée.

#### SUMMARY

Tobacco plants on which a systemic infection due to TMV has developed contains two non-infectious proteins, immunologically related to the virus but without RNA. The electrophoretic mobilities of these two proteins and of the virus are all three different. These proteins are of very small dimensions, are easily aggregated in particles of similar shape as the virus and appear as fine needles, like the virus "crystals", at pH 3.4. They have never been found in leaves where the virus has developed as a consequence of direct infection. A hypothesis on their role in virus multiplication and the conditions of their occurrence has been formulated.

*Bibliographie p. 334.*

## ZUSAMMENFASSUNG

Tabakpflanzen, bei denen sich eine "System-Infektion" gegen TMV entwickelt hat, enthalten zwei nicht infektiöse Proteine, die immunologisch mit dem TM-Virus verwandt sind, aber keine RNA enthalten. Die elektrophoretische Beweglichkeit dieser beiden Proteine sind untereinander und von der des Virus selbst verschieden. Die Partikel beider Proteine sind sehr klein, aggregieren aber leicht zu Partikeln von einer dem Virus ähnlichen Gestalt und erscheinen bei pH 3.4 als feine Nadeln ähnlich den Virus "Kristallen". In Blättern, in denen sich als Folge einer direkten (lokalen) Infektion das TMV entwickelt hat, wurden die beiden Proteine nie gefunden. Es wird eine Hypothese über ihre Rolle in der Virus-Multiplikation gegeben und die Bedingungen ihres Auftretens zusammengefasst.

## BIBLIOGRAPHIE

- <sup>1</sup> R. MARKHAM, R. MATTHEWS ET K. SMITH, *Nature*, 162 (1948) 88.
- <sup>2</sup> R. JEENER ET P. LEMOINE, *Arch. Internat. Physiol.*, 60 (1952) 547.
- <sup>3</sup> R. JEENER ET P. LEMOINE, *Nature*, 171 (1953) 935.
- <sup>4</sup> A. HERSHEY ET M. CHASE, *J. Gen. Physiol.*, 36 (1951) 39.
- <sup>5</sup> W. TAKAHASHI ET M. ISHII, *Am. J. Bot.*, 40 (1953) 85.
- <sup>6</sup> B. COMMONER, M. YAMADA, S. RODENBERG, T. WANG ET E. BASLER, *Science*, 118 (1953) 529.
- <sup>7</sup> R. JEENER ET C. LAVAND'HOMME, *Arch. Internat. Physiol.*, 61 (1953) 427.
- <sup>8</sup> B. COMMONER, F. MERCER, P. MERRIL ET A. ZIMMER, *Arch. Biochem.*, 27 (1950) 271.
- <sup>9</sup> E. KABAT ET M. MAYER, *Experimental Immunochemistry*, Ch. C. Thomas, Springfield, 1948.
- <sup>10</sup> J. OUDIN, *Methods in Medical Research*, vol. 5, Year Book Pub., Chicago, 1952.
- <sup>11</sup> R. MARKHAM, *Progress in Biophys. and Biophys. Chem.*, 3 (1953) 61.
- <sup>12</sup> E. BECKER, J. MUNOZ, C. LAPRESLE ET L. LEBEAU, *J. Immunol.*, 67 (1951) 67.
- <sup>13</sup> R. JEENER, *Biochim. Biophys. Acta*, 13 (1954) 161.
- <sup>14</sup> J. WATSON, *Biochim. Biophys. Acta*, 13 (1954) 10.
- <sup>15</sup> H. EPSTEIN, *Adv. in Virus Res.*, 1 (1953) 1.

Received March 3nd, 1954