

Caractérisation d'une nouvelle souche du virus du flétrissement de la fève isolée de l'artichaut en France

Auguste MIGLIORI, Gian Luigi RANA*, Pasquale PIAZZOLLA**, Jean-Pierre GOURRET*** & Luisa RUBINO**

I.N.R.A., Station de Pathologie végétale, Centre de Recherches de Rennes, F 35650 Le Rheu

* Istituto di Patologia vegetale e forestale, Università della Basilicata, 85100 Potenza (Italie)

** Dipartimento di Patologia vegetale, Università degli Studi, via G. Amendola 165/A, 70126 Bari (Italie)

*** Laboratoire de Biologie cellulaire, UA C.N.R.S. N° 256, Université de Rennes I, F 35042 Rennes Cedex

RÉSUMÉ

Un virus isolé de l'artichaut « Camus de Bretagne » en France est caractérisé selon les critères biologiques, physico-chimiques, sérologiques et cytopathologiques. Il est identifié à une nouvelle souche du Broad Bean Wilt Virus-French Artichoke (BBWV-FA) sur les bases suivantes :

- les réactions des hôtes différentiels, notamment *Chenopodium amaranticolor* ;
- les propriétés physico-chimiques du BBWV-FA, en accord avec celles des autres souches du même virus ;
- les réactions sérologiques qui mettent en évidence :
 - a) un index de différenciation sérologique de 2-3 entre BBWV-FA et un autre isolat observé sur l'artichaut italien « Castellammare » (BBWV-IA),
 - b) une relation entre BBWV-FA et BBWV, sérotypes I et II,
 - c) une relation très éloignée entre BBWV-FA et *Lamium mild mosaic virus* ;
- les aspects ultrastructuraux des viroplasmes comportant des tubules granulaires de 70 nm de diamètre.

Mots clés additionnels : BBWV, biologie, *Capitophorus horni*, cytopathologie, sérologie.

SUMMARY

Characterization of a new strain of broad bean wilt virus isolated from globe artichoke in France.

A virus isolated from artichoke "Camus de Bretagne" in France has been characterized biologically, physico-chemically, serologically and cytopathologically. It was identified as a new strain of broad bean wilt virus-French Artichoke (BBWV-FA) on the following basis: differential host reaction on *Chenopodium amaranticolor*; physico-chemical properties in good agreement with those of other strains of BBWV; a serological differentiation index of 2-3 between BBWV-FA and another isolate of BBWV from Italian artichoke "Castellammare" (BBWV-IA); a relationship between BBWV-FA and BBWV serotypes I and II; a very slight relationship between BBWV-FA and *Lamium mild mosaic virus*; ultrastructural aspects of the viroplasm, which contain granular tubules about 70 nm in diameter.

Additional key words : BBWV, biology, *Capitophorus horni*, serology, cytopathology.

I. INTRODUCTION

Plusieurs virus sont observés chez l'artichaut (RANA & MARTELLI, 1983). En France, l'artichaut qui est principalement cultivé en Bretagne, accuse un affaiblissement depuis une quinzaine d'années. L'étude entreprise, afin de cerner la cause de cette diminution des rendements, a permis d'établir la présence, la répartition, la fréquence et la nuisibilité des virus chez « Camus de Bretagne » (MIGLIORI *et al.*, 1987). Deux virus sur les 6 observés sont fréquents ; il s'agit d'un

potyvirus (Artichoke latent virus = ALV) et d'un virus sphérique qui se rapproche du Broad bean wilt virus (BBWV) (MIGLIORI *et al.*, 1984), que nous avons étudié ici.

Le BBWV signalé chez l'artichaut par RUSSO & RANA (1978) a été mentionné pour la première fois par STUBBS (1947) et décrit par TAYLOR & STUBBS (1972) et, plus récemment par EDWARDSON & CHRISTIE (1986) et LISA & BOCCARDO (à paraître). Certains auteurs comme MATTHEWS (1979), EDWARDSON & CHRISTIE (1986) classent le BBWV dans le groupe des

Comovirus, d'autres comme DOEL (1975), LISA *et al.*, 1982, RUSSO *et al.* (1983) le classent dans un groupe distinct.

La fréquence de l'isolat artichaut BBWV-FA (French artichoke) dans les cultures bretonnes, de même que la présence d'un autre isolat BBWV-IA (Italian artichoke) dans les cultures italiennes (RANA *et al.*, 1987), nous ont conduit à comparer ces 2 virus afin de les situer parmi le BBWV.

Les propriétés biologiques, physico-chimiques, sérologiques et cytopathologiques du BBWV-FA sont comparées à celles des BBWV-IA, BBWV sérotypes I et II (UYEMOTO & PROVVIDENTI, 1974) et au Lamium mild mosaic virus (LMMV), (LISA *et al.*, 1982).

Les résultats de cette étude sont présentés et discutés dans cet article.

II. MATÉRIEL ET MÉTHODES

Les souches étudiées dans cette étude sont les suivantes :

- Isolats de l'artichaut, BBWV-FA et BBWV-IA.
- BBWV sérotype I, isolat de la vigne = BBWV-G (CASTROVILLI *et al.*, 1985). Isolat Nasturtium ringspot virus = NRSV (BOCCARDO & CONTI, 1973).
- BBWV sérotype II, BBWV-PV 131 de l'American type Collection.
- Isolat Lamium mild mosaic virus = LMMV (LISA *et al.*, 1982).

A. Propriétés biologiques

1. Transmission mécanique

BBWV-FA et BBWV-IA sont multipliés sur *Chenopodium quinoa* Willd. L'inoculum est obtenu par le broyage des tissus foliaires (1 g + 4 ml) dans du tampon phosphate 0,01 M pH 7 contenant 0,2 p. 100 de DIECA. L'inoculation est effectuée en présence de 80 mg de charbon végétal et 80 mg de carborundum 600 mesh par ml d'inoculum sur une gamme d'hôtes différentiels placés en serre à 20-24 °C.

2. Transmission par pucerons

Les essais de transmission du BBWV-FA sont effectués par *Capitophorus horni*, Börner et *Myzus persicae*, Sulz, selon le mode non persistant. Dans le cas de BBWV-IA, BBWV-G et BBWV-PV 131, seul *M. persicae* a été utilisé.

Des groupes de 10 pucerons aptères, maintenus en élevage sur artichaut sain ou sur *C. quinoa*, sont déposés après un jeûne de 2 h sur un plant d'artichaut infecté mécaniquement par les virus cités ci-dessus. Les pucerons observés à la loupe binoculaire sont récupérés 1 à 2 min après leur prise alimentaire et déposés (5 individus par plant) sur 10 artichauts « Camus de Bretagne » et 10 *Physalis floridana*, Rydb.

B. Propriétés physico-chimiques

Les caractéristiques d'inactivation et de limite de dilution du BBWV-FA et du BBWV-IA sont détermi-

nées *in vitro* à partir d'extraits 1 g/ml obtenus de *C. quinoa* infecté de façon systémique. Le contrôle est effectué pour chaque cas sur 6 plants de *C. quinoa*.

La technique de purification appliquée pour le BBWV-FA et pour les autres isolats est celle utilisée par LISA (commun. personn.) pour le BBWV isolé de courgette.

Après broyage des feuilles en présence de citrate trisodique 0,25 M et 0,1 p. 100 d'acide thioglycolique, le virus est clarifié, traité au triton X-100 (5 p. 100) puis sédimenté 2 h à 82 000 g. Après une seconde clarification suivie d'une sédimentation (2 h à 82 000 g) le virus est déposé sur des gradients obtenus après décongélation de la solution de citrate trisodique contenant 20 p. 100 de saccharose. L'analyse effectuée après 3 h de centrifugation à 197 000 g (Rotor SW-41) à l'aide d'un analyseur ISCO 640, permet de séparer les fractions virales. Celles-ci sont sédimentées pendant 3 h à 146 000 g et reprises dans une solution de citrate trisodique 0,025 M, pH 7,5.

La détermination des coefficients de sédimentation et des densités en équilibre (buoyant densities), des composants viraux est effectuée par ultracentrifugation avec la centrifugeuse Modèle E. Beckman équipée de l'optique SCHLIEREN.

La centrifugation pour l'équilibre en sulfate de césium est effectuée à 25 °C pendant 16 h à 44 000 r.p.m.

L'acide nucléique est extrait à partir des composants « Middle » et « Bottom » des BBWV-FA et IA, par le phénol-dodésyl-sulfate de sodium (SDS), précipité en présence d'éthanol à 25 °C, puis mis en suspension avec de l'eau distillée stérile. La masse moléculaire est déterminée par électrophorèse en gel d'agarose 1,2 p. 100 en tampon tris-borate pendant 1 h à 100 V. Les échantillons sont dénaturés en présence de 50 p. 100 de formamide déionisée pendant 10 min à 55 °C. Après migration, le gel est coloré au bromure d'éthidium (0,5 µg/ml). Les ARN ribosomiaux de *Escherichia coli* (1,01 et 0,53 × 10⁶ daltons) sont utilisés comme marqueurs ainsi que l'ARN du BBWV-PV 131.

La protéine est préparée à partir de particules virales traitées au tris-(hydroxy-méthyl)-aminométhane, HCl 0,125 M pH 6,8 en présence 1 p. 100 de 2-mercaptoéthanol à 100 °C durant 2 à 3 min. Les protéines sont soumises à l'électrophorèse en gel de polyacrylamide à 15 p. 100 selon la technique décrite par LAEMMLI (1970). La masse moléculaire des polypeptides est déterminée en utilisant comme marqueurs : la phosphorylase b (94 000), le sérum-albumine bovine (67 000), l'inhibiteur de la trypsine du soja (20 000) et l'α-lactoalbumine (14 400).

C. Propriétés sérologiques

Les lapins immunisés par les BBWV-FA et IA ont reçu une 1^{re} injection intramusculaire de 1 mg de virus additionné de 1 ml d'adjuvant incomplet de FREUND, suivie de 2 injections intraveineuses de 1 mg de virus sans adjuvant respectivement 7 et 14 j plus tard. Un rappel est effectué en intraveineuse 15 et 20 j après la dernière injection.

Les relations sérologiques sont déterminées par la méthode de double immunodiffusion en milieu gélosé

composé de 1 p. 100 d'agarose pour électrophorèse en citrate trisodique 0,25 M pH 7,5. Les antigènes BBWV-FA et BBWV-IA (isolats artichauts) sont comparés à l'aide des antisérums BBWV-G, BBWV-NRSV (sérotipe I), BBWV-PV 131 (sérotipe II) et LMMV.

L'immunoélectromicroscopie (IEM) est également appliquée selon le principe de MILNE & LUISONI (1977) pour étudier la parenté sérologique entre le BBWV-FA et le LMMV. L'antisérum LMMV a été utilisé tel que et dilué au 1/10, 1/20 et 1/40.

D. Microscopie électronique

Les composants du BBWV-FA séparés en gradient de saccharose, sont observés au microscope après coloration à l'acétate d'uranyle 2 p. 100.

Des fragments de *Lathyrus odoratus* L., *Nicotiana benthamiana* Dom. infectés par le BBWV-FA sont fixés au glutaraldéhyde 2,5 p. 100 dans une solution cacodylate 0,2 M pH 7,4, puis post-fixés à 4 °C au tétraoxyde d'osmium 1 p. 100. Après déshydratation à l'éthanol, suivi d'un passage à l'oxyde de propylène, les fragments sont imprégnés d'un mélange Epon-Araldite qui est soumis à la polymérisation. Les cou-

pes ultrafines sont observées au microscope électronique après coloration à l'acétate d'uranyle et au citrate de plomb.

III. RÉSULTATS

A. Propriétés biologiques des BBWV-FA et IA

1. Transmission mécanique sur hôtes différentiels

Les BBWV-FA et IA peuvent être transmis aux hôtes herbacés sans difficulté. Le virus est susceptible d'infecter une gamme variée d'hôtes. Les 2 isolats de l'artichaut induisent des réactions relativement analogues sur l'ensemble de la gamme d'hôtes différentiels (tabl. 1). *Chenopodium amaranticolor* Coste et Reyn, réagit seulement par des lésions locales chlorotiques aux 2 isolats artichauts et par une réaction locale et systémique aux BBWV-G et PV 131.

L'isolat italien se différencie de l'isolat français par des taches jaunâtres sur artichaut et des lésions locales nécrotiques plus prononcées sur les feuilles primaires de *Phaseolus vulgaris* L. « Pinto ».

TABLEAU 1

Réactions symptomatologiques des hôtes herbacés à l'infection par BBWV-FA, IA, G et PV 131.
Symptomatological responses of herbaceous hosts to infection by BBWV-FA, IA, G and PV 131.

| HÔTES | RÉACTIONS | | | | | | | |
|----------------------------------------|------------------------------|---------|------------------------------|---------|-----------------------------|---------|----------------------------------|---------|
| | BBWV-FA Locale systémique | | BBWV-IA Locale systémique | | BBWV-G Locale systémique | | BBWV-PV 131 Locale systémique | |
| Amaranthacées | | | | | | | | |
| <i>Celosia cristatata</i> Kyntze | l n | Mo | l n | Mo | — | — | — | — |
| <i>Gomphrena globosa</i> L. | ta. r | Mo | ta. r | Mo | ta. r | Mo | ta. r | Mo |
| Chenopodiacees | | | | | | | | |
| <i>Chenopodium quinoa</i> Willd. | l c | Dist, n | l c | Dist, n | l c | Dist, n | l c | Dist, n |
| <i>C. amaranticolor</i> Coste et Reyn | l c | n i | l c | n i | l c | Dist, n | l c | Dist, n |
| Composées | | | | | | | | |
| <i>Carduus pycnocephalus</i> L. | l n | Lat | l n | Lat | — | — | — | — |
| <i>Cynara scolymus</i> L. | | | | | | | | |
| « Camus de Bretagne » | Lat | Lat | Lat | ta j | n i | n i | Lat | Lat |
| « Locale di Mola » | Lat | Lat | Lat | ta j | — | — | — | — |
| « Violet de Provence » | Lat | Lat | Lat | ta j | n i | n i | Lat | Lat |
| Cucurbitacées | | | | | | | | |
| <i>Cucurbita pepo</i> Duch. | | | | | | | | |
| « Fl Diamant » | n i | n i | n i | n i | n i | n i | n i | n i |
| Légumineuses | | | | | | | | |
| <i>Lathyrus odoratus</i> L. | Lat | Mo | Lat | Mo | Lat | Mo | Lat | Mo |
| <i>Phaseolus vulgaris</i> L. « Pinto » | l n | n i | l n | n i | l n | n i | l n | n i |
| « La Victoire » | l j | n i | l j | n i | l j | n i | l j | n i |
| <i>Vicia faba</i> L. « Ascott » | Lat | Mo | Lat | Mo | Lat | Mo | Lat | Mo |
| <i>Vigna radiata</i> L. (Wilczew) | ta. cn | Mo n | ta. cn | Mo n | — | — | — | — |
| <i>V. unguiculata</i> L. (Walp) | l n | Mo | l n | Mo | l n | Mo | l n | Mo |
| Solanées | | | | | | | | |
| <i>Capsicum annum</i> L. « Bastidon » | n i | n i | n i | n i | Lat | Mo | n i | n i |
| <i>Nicotiana benthamiana</i> Domin. | Lat | Mo | Lat | Mo | Lat | Mo | Lat | Mo |
| <i>N. glutinosa</i> L. | An c | n i | n i | n i | An c | Mo | n i | n i |
| <i>N. rustica</i> L. | Lat | An | Lat | Lat | — | — | — | — |
| <i>V. tabacum</i> L. « Xanthi » | An cn | f. ch n | An cn | f. ch n | ta. c | f. ch | ta. c | ta c |
| <i>Physalis floridana</i> Rydb | Lat | Mo | Lat | Mo | Lat | Mo | Lat | Mo |

An = anneaux *ring spots* ; c = chlorotique *chlorotic* ; Dist = distorsion *distortion* ; f. ch = feuille de chène *etch* ; j = jaunâtre *yellowish* ; l = lésions *lesions* ; Lat = latent *latent* ; Mo = mosaïque *mosaic* ; n = nécrotique *necrotic* ; n i = non infecté *not infected* ; r = rougeâtre *reddish* ; ta = taches *spots* ; — = non éprouvé *not tested*.

Seul le sérotype I (BBWV-G) infecte et provoque des symptômes sur *Capsicum annuum* L. « Bastidon » et *Nicotiana glutinosa* L.

L'artichaut est sensible aux BBWV-IA, FA et PV 131. Ces 2 dernières souches ne provoquent pas des symptômes particuliers. L'inoculation des BBWV-G et NRSV n'a, par contre, pas permis d'infecter les cultivars « Camus de Bretagne » et « Violet de Provence ».

2. Transmission par pucerons

La transmission du BBWV-FA s'est avérée délicate. Le BBWV-FA est transmis par *C. horni*. La transmission du virus est effectuée de l'artichaut à l'artichaut (6 plantes infectées sur 10) mais aussi de l'artichaut à *P. floridana* (3 plantes infectées sur 10).

Dans nos conditions expérimentales, *M. persicae* ne transmet ni le BBWV-FA ni le BBWV-IA. Par contre, il transmet les isolats BBWV-G et BBWV-PV 131.

B. Propriétés physico-chimiques

1. Inactivation. Limite de dilution

L'inoculation du virus après le traitement thermique indique une dénaturation du virus à partir de 50-55 °C, elle est totale à 60 °C. Le virus perd son pouvoir infectieux après une conservation *in vitro* de 6 j à 20 °C ou après dilution à 10⁻⁴. Le BBWV-FA ne se différencie pas du BBWV-IA.

2. Purification

La technique utilisée pour BBWV-FA permet d'obtenir environ 2 mg de virus à partir de 100 g de feuilles de *C. quinoa* infectées.

Après sédimentation en gradient de saccharose, 3 pics sont distingués après analyse du gradient, correspondant aux composants « Top » (T), « Middle » (M) et « Bottom » (B).

3. Coefficients de sédimentation

Les 3 composants du BBWV-FA (T, M, B) sont nettement différenciés après sédimentation par centrifugation analytique, comme le montre le diagramme de SCHLIEREN (fig. 1). Les coefficients de sédimentation du BBWV-FA sont quasi identiques à ceux du BBWV-IA et en accord avec ceux du BBWV-G et BBWV-PV 131 (tabl. 2).

TABLEAU 2

Coefficients de sédimentation des 4 souches du BBWV en citrate trisodique 0,21 M.

Sedimentation coefficients of 4 strains of BBWV 0.21 M sodium citrate.

| Virus | « Top » | « Middle » | « Bottom » |
|----------------------------|---------|------------|------------|
| BBWV-FA | 40 (S) | 63 (S) | 80 (S) |
| BBWV-IA | 37 (S) | 61 (S) | 76 (S) |
| BBWV-G sérotype I | 43 (S) | 69 (S) | 85 (S) |
| BBWV-PV 131 sérotype II | 42 (S) | 69 (S) | 87 (S) |

4. Densité de la particule virale en équilibre

Les densités des composants M et B du BBWV-FA établies en sulfate de césium sont respectivement de 1,35 et 1,37 g/cm³.

5. Masses moléculaires de l'acide nucléique et de la protéine

L'étude de l'acide nucléique du BBWV-FA, a permis de mettre en évidence la migration de 2 composants ARN dans le gel. Les masses moléculaires sont de 2,1 × 10⁶ (ARN-1) et 1,3 × 10⁶ (ARN-2) analogues à celles du BBWV-IA (2,2 × 10⁶ et 1,4 × 10⁶) et du BBWV-PV 131 (2,2 × 10⁶ et 1,6 × 10⁶).

La migration des protéines du BBWV-FA forme 2 bandes dans le gel, qui correspondent à 2 polypeptides distincts, dont les masses moléculaires estimées à 44 000 et 26 000 sont similaires à celles du BBWV-PV 131 (44 000 et 25 000).

C. Propriétés sérologiques

Les 2 isolats obtenus d'artichaut BBWV-FA et IA sont reliés sérologiquement comme le prouvent les réactions hétérologues observées avec les mêmes anti-IA et FA. La comparaison des titres homologues et hétérologues de ces antisérums, montre que les 2 isolats ne sont pas sérologiquement identiques ; les valeurs de SDI (VAN REGENMORTEL & VON WECHMAR, 1970) ont été estimées à 2 et 3.

Cette différence est confirmée par les épreuves de double-immunodiffusion qui font apparaître un épéron au point de raccordement des lignes de précipitation relatives à ces 2 virus (fig. 2).

L'isolat français BBWV-FA est également relié aux autres souches de BBWV appartenant aux 2 sérotypes I et II précédemment décrits ; mais dans les mêmes conditions expérimentales, il s'avère que les arcs de précipités obtenus en utilisant des antisérums homologues du sérotype II, sont plus prononcés que ceux obtenus avec l'antisérum correspondant au sérotype I (fig. 3).

Les figures 4, 5 et 6 précisent les parentés sérologiques existant entre les 2 isolats BBWV-FA et IA et les sérotypes I et II du BBWV. Cependant, les arcs de précipités obtenus avec les isolats BBWV-FA, BBWV-IA, BBWV-G et les antisérums sérotype II (fig. 5) et le sérotype I (fig. 6) forment un épéron sans raccordement, ces réactions permettent de différencier les isolats de l'artichaut des sérotypes I et II.

Dans nos conditions expérimentales, les isolats BBWV-FA et IA n'ont pas réagi en double-immunodiffusion avec le sérum anti-LMMV (fig. 4). Par contre, en immunoelectromicroscopie, nous avons pu obtenir la décoration des particules virales du BBWV-FA en utilisant l'antisérum LMMV non dilué (fig. 7).

D. Microscopie électronique

1. Observation des particules virales après purification

L'observation des 3 composants du BBWV-FA après coloration négative a révélé des particules iso-

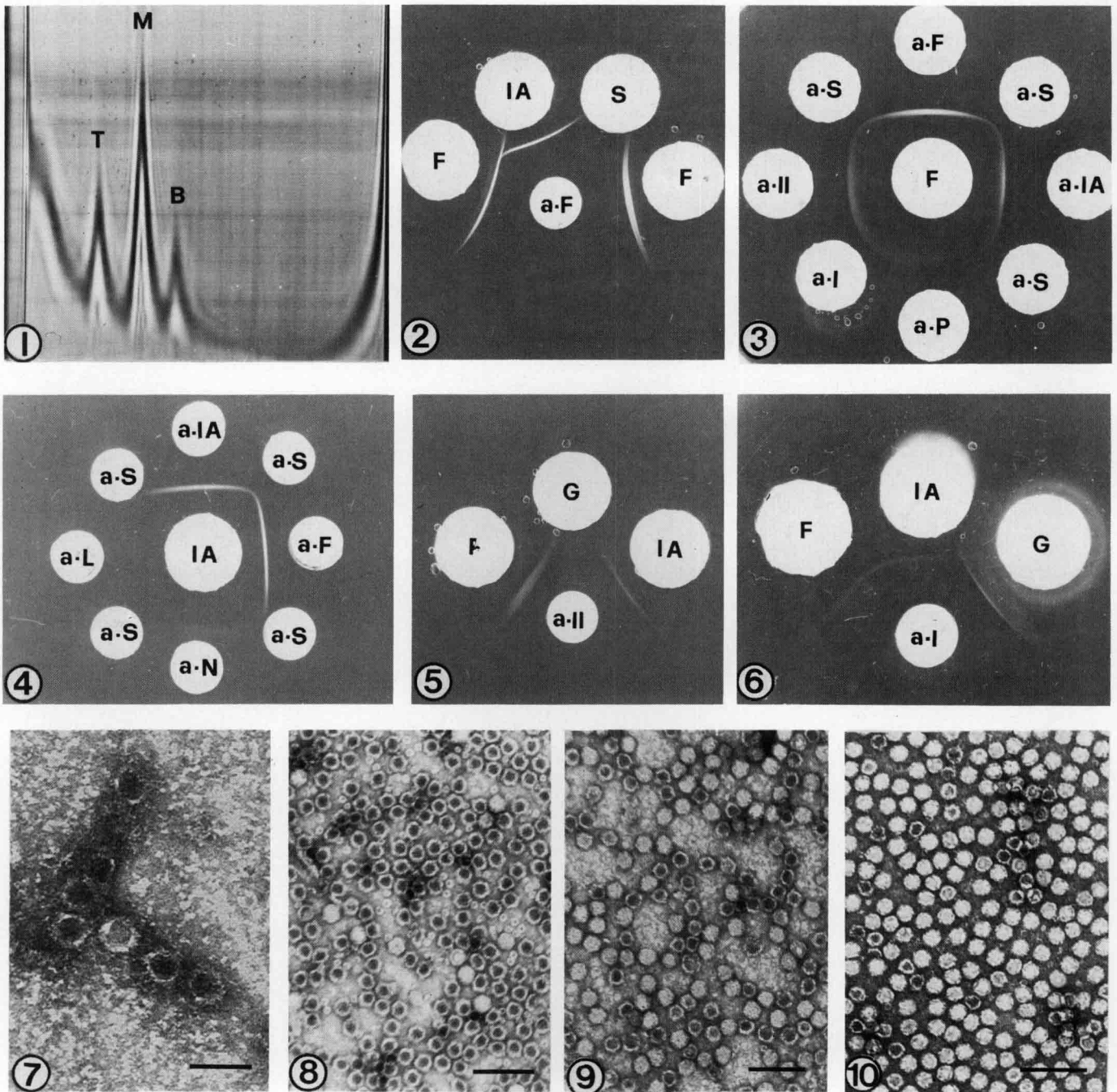


Figure 1
Diagramme Schlieren à la centrifugation analytique d'une préparation virale non fractionnée qui montre 3 composants viraux spécifiques désignés « Top » (T), « Middle » (M) et « Bottom » (B).
Schlieren diagram of an unfractionated virus preparation in the analytical ultracentrifuge, showing 3 virus-specific components denoted as Top (T), Middle (M) and Bottom (B) sedimenting at different rates.

Figures 2, 3, 4, 5 et 6
Epreuves sérologiques en double-immunodiffusion en milieu gélosé qui montrent que le BBWV-FA est sérologiquement différent du BBWV-IA (2); les 2 souches artichaut sont sérologiquement reliées au BBWV sérotype II (3 et 5) et au sérotype I (3, 4 et 6).
Double diffusion serological tests in agarose showing that BBWV-FA is serologically different from BBWV-IA (2); the two artichoke strains are serologically related to serotype II of BBWV (3 and 5) and serotype I (3, 4 and 6).

Antigènes utilisés à la concentration de 0,5 mg/ml.
Antigens used at a concentration of 0.5 mg/ml.

F = BBWV-FA ; IA = BBWV-IA ; G = BBWV-G ; S = extrait de C. quinoa sain (S = healthy C. quinoa).

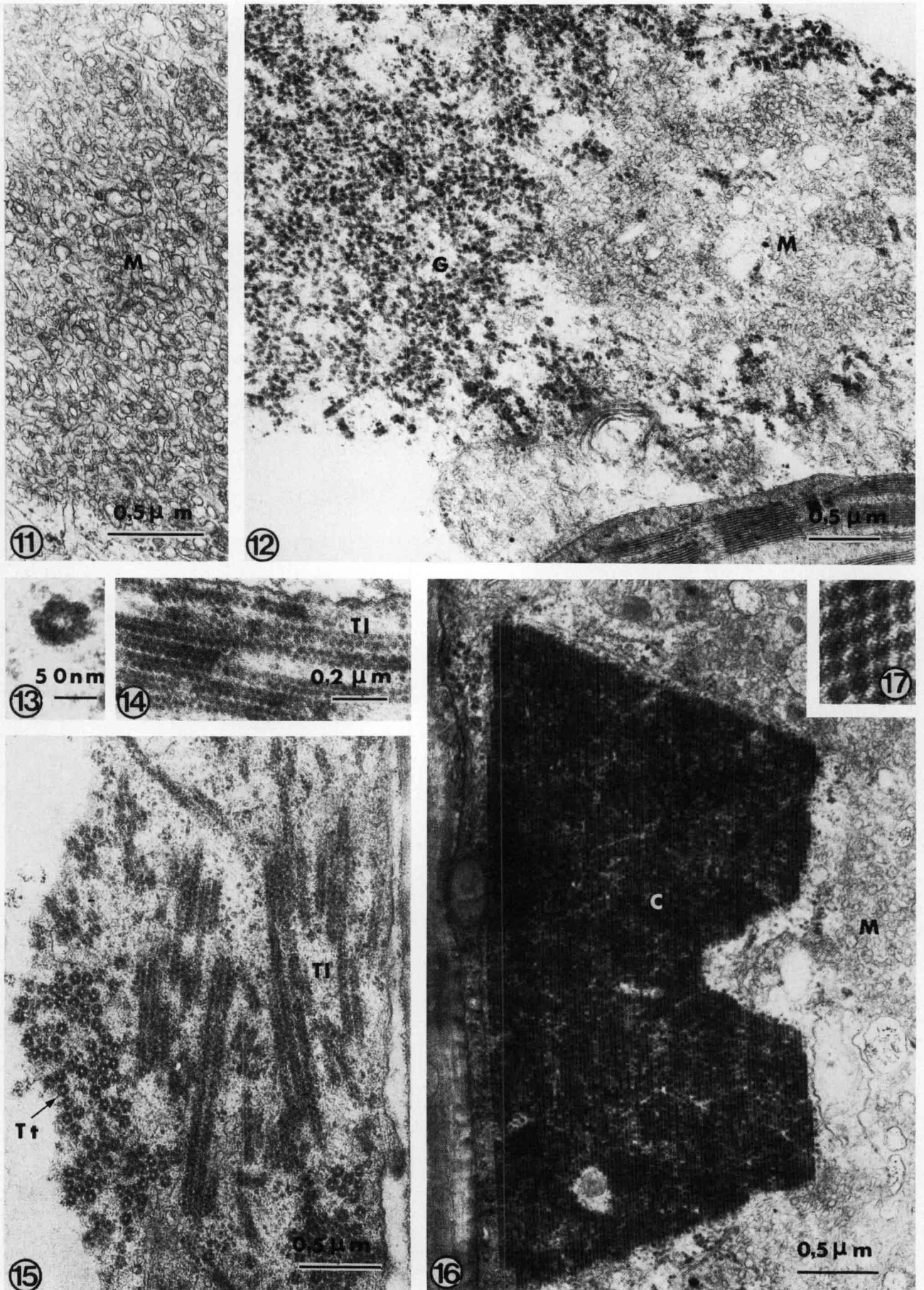
Antisérums : a-F = BBWV-FA ; a-IA = BBWV-IA ; a-I = BBWV-I ; a-N = NRSV ; a-II = BBWV-II ; a-P = BBWV-PV 131 ; a-L = LMMV ; a-S = protéines normales de C. quinoa (a-S = normal proteins of C. quinoa).

Figure 7
BBWV-FA décoré par l'antisérum LMMV non dilué, Barre = 50 nm.
BBWV-FA decorated by undiluted LMMV antiserum, Bar = 50 nm.

Figures 8, 9 et 10
Particules virales du BBWV-FA. Composants « Top », les particules sont pénétrées par la coloration négative (8), « Middle » (9) et « Bottom » (10), Barre = 100 nm.
Virus particles of BBWV-FA. Components Top, the particles are penetrated by negative stain (8), Middle (9) and Bottom (10), Bar = 10 nm.

métriques d'environ 25-27 nm de diamètre. Le composant « Top » est constitué de particules en majorité creuses, pénétrées par le colorant (fig. 8), le

« Middle » est composé de particules entières pour la plupart (fig. 9), le composant « Bottom » est formé de particules entières et bien structurées (fig. 10).



2. Cytopathologie

Les cellules de *L. odoratus* et de *N. benthamiana* infectées par le BBWV-FA se distinguent des cellules du témoin par la présence de 1 et parfois 2 viroplasmes plus ou moins volumineux. Ces viroplasmes sont surtout importants dans les cellules du parenchyme chlorophyllien et dans les poils de *N. benthamiana*. Par leur extension au sein du cytoplasme pariétal, ils déforment parfois la vacuole centrale en repoussant le tonoplaste. Les constituants observés dans ces inclusions dépendent du délai écoulé depuis l'inoculation. Les viroplasmes les plus complets s'observent à partir de 10 à 15 j. A ce stade, le viroplasma comprend :

a) un réseau membranaire irrégulier de tubules contournés ménageant de place en place des vésicules dilatées à contenu fibreux (fig. 11),

b) des granules denses à limites peu nettes, mesurant environ 25 à 30 nm de diamètre dispersés irrégulièrement entre les mailles du réseau membranaire (fig. 12),

c) des tubules granulaires légèrement flexueux, ayant un diamètre d'environ 70 nm isolés ou regroupés en faisceaux d'orientation variable mais demeurant parallèles au tonoplaste (fig. 14 et 15). Les granules de 25 à 30 nm formant les tubules sont constitués autour d'un axe creux d'environ 15 nm, cette disposition confère aux sections transversales des tubules un contour pentagonal (fig. 13 et 15),

d) un cristal de granules bien délimités mesurant environ 27 nm à centre plus ou moins dense aux électrons (fig. 16 et 17),

e) quelques globules lipidiques.

Des mitochondries nombreuses et parfois quelques dictyosomes sont observés à la limite du viroplasma.

Les granules des tubules et des cristaux sont assimilés à des virions pouvant, dans certains cas, être formés de la capsidie vide ne renfermant pas d'ARN. Les granules évoqués en *b* forment les plages granuleuses irrégulières du viroplasma, représentant probablement des virus immatures. Il est à noter aussi que les tubules granulaires et les cristaux s'excluent mutuellement. Enfin, ni l'un ni l'autre ne s'observent en début

d'infection. Le viroplasma est très restreint et ne comporte qu'un réseau membranaire. Celui-ci se développe, acquiert des plages granuleuses et commence à produire soit des tubules de virions, soit des cristaux (fig. 14, 15 et 16).

IV. DISCUSSION ET CONCLUSION

Les résultats obtenus dans cette étude, permettent de différencier le BBWV-FA des autres souches connues.

Cette différence est établie au niveau des hôtes différentiels, du vecteur, de la sérologie et de la cytopathologie.

— Hôtes différentiels. Les réactions de quelques hôtes infectés par le BBWV-FA diffèrent de celles obtenues avec les souches connues du BBWV. Le BBWV-FA et le BBWV-IA se différencient surtout chez *C. amaranticolor* par une réaction locale, tandis que *C. quinoa* réagit par des lésions locales et une déformation apicale. Les 2 *Chenopodium* sont toujours mentionnés comme étant sensibles au BBWV (JURETIĆ *et al.*, 1970 ; FROWD & TOMLINSON, 1972 ; GRACIA & FELDMAN, 1976 ; WEIDEMANN *et al.*, 1975 ; VEGA *et al.*, 1980 ; LISA *et al.*, 1982 ; EDWARDSON & CHRISTIE, 1986) à l'exception de l'isolat du petit pois observé en Egypte qui induit une réaction locale chez les 2 *Chenopodium* (KISHTAH *et al.*, 1978). Le BBWV-IA se distingue essentiellement du BBWV-FA par des taches jaunâtres chez *Cynara scolymus* BBWV-FA et BBWV-PV 131 infectent ce dernier sans induire de symptôme. BBWV-G et NRSV (sérotipe I) n'infectent pas *C. scolymus* dans nos conditions expérimentales. Cette observation suppose que le BBWV signalé chez l'artichaut en Italie par RUSSO & RANA (1978) pourrait être plus apparenté au sérotipe II qu'au sérotipe I.

— Vecteur. Le BBWV-FA est transmis par *C. horni* et non par *M. persicae*, vecteur cité pour toutes les souches étudiées du BBWV (TAYLOR & STUBBS,

Figure 11

Réseau membranaire d'un viroplasma $\times 36\ 000$.

Membranous reticulate part of a viroplasm $\times 36\ 000$.

Figure 12

Viroplasma montrant à la fois un réseau membranaire et une zone granulaire $\times 26\ 000$.

Viroplasm showing both a membranous reticulate net and a granulate area $\times 26\ 000$.

Figure 13

Coupe transversale d'un tubule de virions. Noter la forme approximativement pentagonale $\times 160\ 000$.

Transverse section of a tubule of virions. Notice the approximate pentagonal shape $\times 160\ 000$.

Figure 14

Tubules de virions vus en coupe longitudinale $\times 50\ 000$.

Longitudinally sectioned tubules of virions $\times 50\ 000$.

Figure 15

Tubules de virions en coupes transversales et longitudinales $\times 30\ 000$.

Transverse and longitudinal sections of the tubular aggregates of virus particles $\times 30\ 000$.

Figure 16

Cristal de virions $\times 30\ 000$.

Crystal of virus particles $\times 30\ 000$.

Figure 17

Alignement de virions dans un cristal $\times 160\ 000$.

Virus particles aligned within a crystal $\times 160\ 000$.

G : zone granuleuse du viroplasma ; M : membranes ; Tl : tubules de virions en coupe longitudinale ; Tt : tubules de virions en coupe transversale.

G : granulate area of a viroplasm ; M : membranes ; Tl : longitudinal section of tubular aggregates of virus particles ; Tt : transverse section of tubular aggregates of virus particles.

1972 ; BOCCARDO & CONTI, 1973 ; SAHAMI *et al.*, 1973 ; MARROU *et al.*, 1976 ; LOCKHART & BETZOLD, 1982 ; GRACIA & GUTIERREZ, 1982 ; EDWARDSON & CHRISTIE, 1986 ; LISA & BOCCARDO (à paraître). La transmission du BBWV-FA par *C. horni* s'avère néanmoins délicate.

— Les propriétés physico-chimiques du BBWV-FA et IA sont analogues à celles du BBWV décrites par DOEL (1975), EDWARDSON & CHRISTIE (1986), LISA & BOCCARDO (à paraître). Les 2 isolats artichaut, peuvent être, en conséquence, assimilés au BBWV.

— Sérologie. L'étude sérologique a permis d'établir la parenté entre les 2 souches du BBWV-FA et IA, isolées d'artichaut et les autres souches du BBWV appartenant aux 2 sérotypes I et II.

En double-immunodiffusion, les arcs de précipités relatifs aux 2 antigènes BBWV-FA et IA se raccordent en formant un éperon ; ces 2 virus appartiennent par conséquent à des sérotypes différents.

Les arcs de précipités obtenus avec les isolats de l'artichaut et les sérotypes I et II forment un éperon sans se raccorder, cette réaction suppose que les BBWV-FA et IA n'appartiennent pas aux 2 sérotypes mentionnés.

L'immunodiffusion n'a pas révélé de réaction entre le BBWV-FA et IA et le sérum anti-LMMV. Toutefois la parenté sérologique entre le BBWV-FA et le LMMV a été mise en évidence par l'immunoélectromicroscopie. Il s'agit d'une relation sérologique très éloignée, ce résultat conforte ceux obtenus par LISA *et al.* (1982) établissant une parenté sérologique entre le LMMV et le sérotype I du BBWV, mais aucune parenté entre ce virus et le sérotype II.

— Cytopathologie. Les données ultrastructurales

concernant les différentes souches du BBWV sont très nombreuses (RUBIO-HUERTOS, 1968 ; JURETIČ *et al.*, 1970 ; MILIČIĆ *et al.*, 1974 et 1976 ; CADILHAC & MARROU, 1976 ; KISHTAH *et al.*, 1978 ; VEGA *et al.*, 1980). Elles montrent à la fois des caractères constants — le réseau membranaire et les zones granulaires — mais aussi une grande variabilité ou polymorphisme des arrangements de virions.

Dans le cas du BBWV-FA, les tubules granulaires ne montrent pas d'association avec les vacuoles secondaires comme ceux cités par RUSSO & MARTELLI (1975) ; VEGA *et al.* (1980) et surtout le diamètre (70 nm) et la structure des tubules sont différents de ceux observés avec les souches du BBWV mentionnés par RUBIO-HUERTOS (1968) ; RUSSO & MARTELLI (1975) ; VEGA *et al.* (1980).

Les propriétés biologiques et sérologiques ont permis de distinguer l'isolat français (FA) de l'isolat italien (IA).

Les caractéristiques biologiques, sérologiques et cytopathologiques permettent de distinguer le BBWV-FA des souches connues du BBWV.

Reçu le 22 avril 1987.

Accepté le 6 janvier 1988.

REMERCIEMENTS

Nous remercions vivement Raffaele LAFORTEZZA (Dipartimento di Patologia Vegetale, Università degli studi, Bari). Mlle BOGUAIS (Laboratoire de Biologie Cellulaire, Université de Rennes I) pour leur contribution aux préparations en microscopie électronique. Les Prof. LISA & CONTI (Laboratoire de Phytovirologie appliquée C.N.R. Turin) et le Prof. PROVIDENTI (Dept. of Plant Pathology New York State Agri. Exp. Station, Geneva U.S.A.) pour les souches et les antisérums.

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Boccardo G., Conti M., 1973. Purification and properties of *Nasturtium* ringspot virus. *Phytopathol. Z.*, **78**, 14-24.
- Cadilhac B., Marrou J., 1976. Virus du flétrissement de la Fève (BBWV) : une étude ultrastructurale. *Ann. Phytopathol.*, **8** (4), 471-476.
- Castrovilli, Savino V., Castellano M. A., Engelbrecht D. J., 1985. Characterization of a grapevine isolate of broad bean wilt virus. *Phytopath. mediterr.*, **24**, 35-40.
- Doel T. R., 1975. Comparative properties of type, nasturtium ringspot and petunia ringspot strain of broad bean wilt virus. *J. gen. Virol.*, **26**, 95-108.
- Edwardson J. R., Christie R. G., 1986. Viruses infecting forage legumes. Vol. I. *Monograph.*, **14**, 95-100.
- Frowd J. A., Tomlinson J. A., 1972. Relationship between a parsley virus, nasturtium ringspot virus and broad bean wilt virus. *Ann. Appl. Biol.*, **72**, 189-195.
- Gracia O., Feldman J. M., 1976. Studies on weed plant as sources of viruses. IV. Broad bean wilt virus in *Sisymbrium irio* and *Plantago lanceolata* in Argentina. *Phytopathol. Z.*, **85**, 227-236.
- Gracia O., Gutierrez L. S., 1982. Broad bean wilt virus in pepper crops in Argentina. *Phytopathol. mediterr.*, **21**, 107-109.
- Juretič N., Miličić D., Schmelzer, 1970. Zur Kenntnis des Ringmosaik-Virus der Kapuzinerkress (nasturtium ringspot virus) und seiner Zell-Einschlusskörper. *Acta Bot. Croat.*, **29**, 17-26.
- Kishtah A. A., Russo M., Tolba M. A., Martelli G. P., 1978. A strain of broad bean wilt virus isolated from pea in Egypt. *Phytopathol. mediterr.*, **17**, 157-164.
- Laemmler U. K., 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature, London.*, **227**, 680-685.
- Lisa V., Luisoni E., Boccardo G., Milne R. G., Lovisolo O., 1982. *Lamium mild mosaic virus* : a virus distantly related to broad bean wilt. *Ann. Appl. Biol.*, **100**, 467-476.
- Lisa V., Boccardo G. Broad bean wilt virus and allied viruses. In : HARRISON & MURANT. *The plant viruses. Viruses with bipartite RNA genomes and isometric particles*. Plenum, New York (à paraître).
- Lockhart B. E. L., Betzold J. A., 1982. Broad bean wilt virus in Begonia in Minnesota. *Plant Dis.*, **66**, 72-73.
- Marrou, Duteil M., Leclant F., Cadilhac Brigitte, Esvan C., 1976. Mise en évidence du Virus du Flétrissement de la Fève Broad bean wilt virus (BBWV) dans des laitues présentant des symptômes de marbrure. *Ann. Phytopathol.*, **8** (4), 461-469.
- Matthews R. E. F., 1979. Classification and nomenclature of viruses. *Intervirology*, **12** (3-5), 132-296.
- Migliori A., Lot H., Pecaut P., Duteil, Rouze-Jouan J., 1984. Les virus de l'artichaut. I. Mise en évidence de 3 virus dans les cultures françaises d'artichaut. *Agronomie*, **4**, 257-268.
- Migliori A., Homo E., Corre J., Marzin H., Le Gal V., Curvale J. P., 1987. Répartition, fréquence et nuisibilité des virus chez l'artichaut en Bretagne. *P.H.M. Rev. hortic.*, **274**, 29-36.
- Miličić D., Wrischer M., Juretič N., 1974. Intracellular inclusion bodies of broad bean wilt virus. *Phytopath.*, **80**, 127-135.

- Miličić D., Juretić N., Pleše N., Wrischer M.**, 1976. Some data on cell inclusions and natural hosts of broad bean wilt virus. *Acta Bot. Croat.*, **35**, 17-24.
- Milne R. G., Luisoni E.**, 1977. Rapid immune electron microscopy of virus preparations. In: *Methods in Virology*, 6 (K. MARAMOROSCH & H. KOPROWSKI, Eds), Academic Press, New York, 265-281.
- Rana G. L., Martelli G. P.**, 1983. Le virosi delle piante ortive: Virosi del carciofo. *L'Italia agricola*. Gennaio-Marzo, anno **120**, 27-38.
- Rana G. L., Migliori A., Ragozzino A.**, 1987. La maculatura gialla del carciofo in Campania e Puglia. *Inf. Fitopatol.*, **37** (4), 41-43.
- Rubio-Huertos M.**, 1968. Further studies on ultrastructure of plants infected with Petunia ringspot virus. *Protoplasma*, **65**, 465-476.
- Russo M., Martelli G. P.**, 1975. Light and electron microscopy of broad bean wilt virus intracellular inclusions. *J. Submicr. Cytol.*, **7**, 335-347.
- Russo M., Rana G. L.**, 1978. Occurrence of two legume viruses in artichoke. *Phytopathol., mediterr.*, **17**, 212-216.
- Russo M., Savino V., Vovlas C.**, 1983. Virosi della fava. *L'Italia agricola*. Le virosi delle piante ortive Gennaio-Marzo, anno **120**, 83-95.
- Sahambi H. S., Milne R. G., Cook S. M., Gibbs A. J., Woods R. D.**, 1973. Broad bean wilt and nasturtium ringspot virus are related. *Phytopathol. Z.*, **76**, 158-165.
- Stubbs L. L.**, 1947. A destructive vascular wilt virus disease of broad bean (*Vicia faba* L.) in Victoria. *J. Dep. Agric. Vict.*, **46**, 323-332.
- Taylor R. H., Stubbs L. L.**, 1972. Broad bean wilt virus. *CMI/AAB Descr. Plant Viruses*, **81**.
- Uyemoto J. K., Provvidenti R.**, 1974. Isolation and identification of two serotypes of broad bean wilt virus. *Phytopathology*, **64**, 1547-1548.
- Vega J., Gracia O., Feldman J. M.**, 1980. Characteristics of Argentine broad bean wilt virus: cytopathological aspects. *Phytopathol. Z.*, **99**, 242-280.
- Van Regenmortel M. H. V., Von Wechmar M. B.**, 1970. A re-examination of the serological relationship between tobacco mosaic virus and cucumber mosaic virus 4. *Virology*, **41**, 330-338.
- Weidemann H. L., Lesemann D., Paul H. L., Koenig R.**, 1975. Das broad bean wilt, virus als Ursache für eine neue Vergilbungs-krankheit des Spinats in Deutschland. *Phytopathol. Z.*, **84**, 215-221.