

centrifugation ces tubes seront congelés puis débités en tranches d'épaisseur déterminée. Mais la difficulté reste encore de trouver la matière convenable pour la confection de ces petits récipients. Les tubes de verre se brisent, soit pendant la marche de l'appareil, soit pendant la congélation, ou bien ils ne peuvent être aisément découpés en tranches. Les tubes en caoutchouc, même de la qualité la plus résistante, s'enfoncent pendant la marche en expulsant une partie du liquide. Les tubes en bakélite se brisent ou se fissurent. L'ébonite est une matière beaucoup plus intéressante, car elle peut être préparée en qualités de diverses duretés. Si la qualité dure se fissure comme la bakélite, par contre la qualité 3/4 dure est juste assez résistante pour ne pas s'affaisser sous la pression et suffisamment souple pourtant pour ne pas se briser ni se fendre. De plus, après centrifugation et congélation, les tubes en ébonite 3/4 dure se découpent avec la plus grande facilité à l'aide d'une lame de rasoir.

Enfin, pour la toupie dont les godets n'ont que 4 mm. de diamètre, j'ai trouvé une solution particulièrement favorable. Il existe dans le commerce, pour la dégustation des boissons glacées, des pailles artificielles en cellulose et qui ont à peu près ce diamètre. Il suffit de les découper en bouts de 20 mm. de long et d'en obturer l'une des extrémités en la trempant à plusieurs reprises dans une solution convenable d'acétate de cellulose. On munit ainsi ces petits tubes, par une sorte de soudure autogène, de fonds parfaitement résistants. Ces tubes supportent sans dommage la centrifugation et la congélation et peuvent être aisément découpés en tranches. Ils ont, de plus, l'avantage d'être transparents.

Ainsi outillé, j'ai pu enfin procéder à des essais sur les nombreux bactériophages les plus divers que je possède, puis au titrage des particules actives présentes à différents niveaux de la colonne liquide après des centrifugations faites, soit pendant un temps constant à des vitesses croissantes, soit à une vitesse constante pendant des temps croissants, et établir ainsi des courbes de sédimentation aussi complètes que possible.

Cette étude n'étant pas entièrement terminée, j'en rapporterai prochainement les résultats définitifs. Il va sans dire que cette technique mise au point pour les bactériophages est également applicable à beaucoup d'autres éléments ainsi que nous le verrons ultérieurement.

(Institut de bactériologie de l'Université de Liège.)

DE L'ULTRACENTRIFUGATION DES VIRUS DES PLANTES,

par ANDRÉ GRATIA et PAUL MANIL.

Dans la note précédente, ainsi que dans plusieurs communications antérieures (1), l'un de nous a insisté sur l'inconvénient que peut présenter la forme conique du récipient contenant le liquide à centrifuger dans l'appareil de Henriot et Huguenard. Les particules sédimentées pendant la centrifugation, peuvent être toutes ou en partie remises en suspension par le tourbillon qui se produit dans le liquide lors du retour à la position de repos. C'est pourquoi il a imaginé, pour y remédier, plusieurs techniques différentes selon les contingences expérimentales et qui ont été décrites dans ses dernières communications.

Il y a des cas cependant où le sédiment est, de par sa nature, si adhérent à la rainure périphérique de la coupelle qu'il échappe à la remise en suspension. C'était le cas notamment lorsque des microbes ou des bactériophages avaient été centrifugés dans certains échantillons de bouillon ordinaire contenant une sorte de gomme qui colle le sédiment à la périphérie. C'est encore le cas, ainsi que l'un de nous l'a également signalé, pour les sucres de plantes, lesquels contiennent en abondance des matières collantes, notamment de la pectine. Si donc après les avoir congelées à l'aide de neige carbonique nous passons au presse-fruits quelques feuilles de *Nicotiana tabacum* atteint de la mosaïque ordinaire du tabac, nous en extrayons un suc abondant, épais et très trouble que nous centrifugeons dans la coupelle pendant 5 minutes à une pression d'air de 1 kgr., soit à une vitesse de 45.000 tours-minute. A l'arrêt, nous retirons de la coupelle le liquide surnageant fortement coloré en brun foncé, mais tout à fait limpide; tandis que dans la rainure de la coupelle reste intimement adhérent, un gros sédiment de particules végétales. Le liquide limpide surnageant est très virulent. Faisons de même avec du suc de tabac atteint du « tobacco necrosis » de K. Smith et mélangeons les deux sucres virulents ainsi clarifiés. Soumettons ce mélange de deux virus à de nouvelles centrifugations d'intensités croissantes et prélevons après chacune d'elles des échantillons dont nous titrons la virulence sur *Nicotiana glutinosa* pour le virus de la mosaïque

(1) C. R. de la Soc. de biol., 1934, t. 117, p. 1228; *ibid.*, 1937, t. 125, pp. 371 et 1057. Congrès de chimie biologique, Bruxelles, octobre 1935. Bull. Soc. chimie biol., 1936, t. 18, p. 208.

du tabac et sur *Phaseolus* pour le virus du « tobacco necrosis ». Voici les résultats obtenus :

| Centrifugations (tours minute) | Mosaïque du Tabac | Tobacco necrosis |
|-----------------------------------|---------------------------|-------------------------|
| 5 min. à 2 kgs (60.000) | 361 lésions (10 feuilles) | 68 lésions (3 feuilles) |
| 10 min. à 3 kgs (70.000) | 123 lésions (10 feuilles) | 23 lésions (3 feuilles) |
| 10 min. à 4 kgs (80.000) | 52 lésions (10 feuilles) | 17 lésions (3 feuilles) |

Comme on le voit, les deux virus mélangés soumis aux mêmes centrifugations suivent des courbes de sédimentation fort nettes et très semblables, très semblables aussi à celles que l'un de nous a rapportées pour des bactériophages en suspension dans du bouillon et centrifugés dans la coupelle (1). Tel est le premier résultat que nous avons obtenu il y a déjà quelque temps et depuis lors nous poursuivons des essais plus méthodiques et plus précis que nous rapporterons ultérieurement. Malheureusement, ces titrages sont beaucoup moins commodes que les titrages de bactériophages : ils exigent un grand nombre de plantes et les résultats sont moins rapides. Aussi avons-nous, entre temps, procédé à des centrifugations en recherchant, non plus les variations de la virulence, mais celles de la protéine cristallisable de Stanley, en utilisant la méthode plus simple de Bawden, qui consiste à chauffer le suc de tabac mosaïqué à 70°, pendant quelques instants, de façon à le dépouiller de ses constituants coagulables et non virulents, puis à ajouter à 3 volumes de ce liquide ainsi dégrossi, 1 volume d'une solution saturée de sulfate d'ammoniaque contenant 5 p. 100 d'acide acétique glacial.

Voici comment nous procédons. Le suc brut de tabac mosaïqué, d'abord chauffé quelques instants à 70°, est soumis à une centrifugation de 5 minutes à 1 kgr. de façon à sédimenter les débris végétaux et les matières coagulées. Si à 3 volumes du liquide surnageant limpide mais fortement coloré, on ajoute 1 volume de la solution de sulfate d'ammoniaque acétique, il se forme un précipité de cristaux de Stanley mélangés à d'abondantes impuretés amorphes et pigmentées. Si la centrifugation a été plus énergique, on voit la quantité de cristaux diminuer et il suffit déjà d'une centrifugation de 15 minutes à 4 kgr., soit à 80.000-tours-minute pour que le précipité produit par l'addition de sulfate d'ammoniaque acétique ne contienne plus que des matières amorphes et plus un seul cristal. Nous en avons déduit la technique suivante pour obtenir les cristaux de Stanley : 25 c.c. de jus brut de tabac mosaïqué sont chauffés à 70°, puis dépouillés par une première centrifugation de 5 minutes à 1 kgr. Le liquide surnageant très limpide, mais fortement coloré, est ensuite centrifugé pendant 15 minutes à 4 kgr. de façon à sédimenter entière-

ment la protéine cristallisable. Le liquide surnageant resté toujours aussi coloré est décanté, puis la coupelle prudemment rincée avec de l'eau de canalisation afin d'enlever les dernières traces de liquide surnageant. L'on met alors en suspension le léger sédiment incolore qui se trouve fortement adhérent à la périphérie de la coupelle, en rinçant celle-ci très énergiquement cette fois avec 3 c.c. d'eau de canalisation. Ce liquide est presque incolore et légèrement trouble. Une centrifugation de quelques instants à la centrifugeuse ordinaire sédimente ce trouble et le liquide clair surnageant est additionné de 1 c.c. de sulfate d'ammoniaque acétique. On obtient aussitôt un très abondant précipité nacré et soyeux qui, examiné au microscope, se montre exclusivement constitué des cristaux de Stanley. Si on le juge nécessaire, on peut encore procéder à des lavages de ce précipité dans une solution acétique de sulfate d'ammoniaque au quart de saturation, puis à des recristallisations successives, après des redissolutions dans l'eau de canalisation ou dans une solution tampon de pH 7. En combinant l'ultracentrifugation à la méthode de Bawden, nous avons ainsi réalisé une technique fort simple et extrêmement rapide, puisqu'elle ne demande guère plus d'une heure, pour obtenir des cristaux de Stanley dans un état d'extrême pureté.

En appliquant cette technique, non plus à des plantes de *Nicotiana tabacum* où le virus a provoqué une infection généralisée, mais à des plantes de *Nicotiana glutinosa* où le même virus a produit de nombreuses lésions locales, nous n'avons trouvé aucune trace de cristaux de Stanley. Ce résultat ne nous a pas étonnés, car, il y a longtemps déjà, nous avons vu que le même matériel ne floccule pas non plus par l'addition du sérum antimosaïque du tabac. En ce qui concerne la protéine spécifique qui avait fait l'objet de nos études sérologiques au cours de ces trois dernières années et que Stanley a réussi le premier à obtenir sous une forme cristalline, il existe donc une différence nette entre l'infection générale et l'infection locale. Cette différence aurait une importance fondamentale si elle devait être qualitative plutôt que quantitative. Aussi, nous y reviendrons dans une prochaine communication.

(Institut de bactériologie de l'Université de Liège
et Institut agronomique de l'Etat à Gembloux.)