

Structure trilamellaire des deux membranes qui entourent les organismes procaryotes associés à la maladie du «greening» des agrumes.

Monique GARNIER et J.M. BOVÉ *

STRUCTURE TRILAMELLAIRE DES DEUX MEMBRANES QUI ENTOURENT LES ORGANISMES PROCARYOTES ASSOCIES A LA MALADIE DU «GREENING» DES AGRUMES.

Monique GARNIER et J.M. BOVE

Fruits, Dec. 1977, vol. 32, n°12, p. 749-752.

RESUME - L'enveloppe cellulaire de l'organisme procaryote associé à la maladie du «greening» des agrumes a une épaisseur de 250 Å et possède une double membrane : une membrane cytoplasmique interne et une membrane externe. La structure trilamellaire de ces deux membranes a été établie. La couche interne de la membrane externe rappelle la couche à peptidoglycane des bactéries à Gram négatif.

INTRODUCTION.

Pour importante que soit la maladie du «stubborn» des agrumes dans le Bassin méditerranéen, au Proche-Orient et dans le Sud-ouest des Etats-Unis, la maladie du «greening» est une affection encore plus grave en Afrique australe, en Inde, en Chine, dans le Sud-est asiatique et pour ce qui est de la France, à l'île de la Réunion.

Au début de 1970 LAFLECHE et BOVE (1970 a) ont mis en évidence pour la première fois chez les agrumes la présence de «structures» ressemblant à des mycoplasmes dans les tubes criblés de feuilles d'orangers atteints de «greening». Mais avec la découverte, peu de temps après, des «structures» associées au «stubborn» (IGWEGBE et CALAVAN, 1970), la possibilité était offerte de comparer les formes respectives du «stubborn» et du «greening» dans le même matériel végétal. D'après leur aspect morphologique *in situ* dans les tubes criblés, il était clair que ces formes ne correspondaient pas au même type d'organisme (LAFLECHE et BOVE, 1970 b). En observant de plus près l'ultrastructure des deux organismes, ces auteurs trouvaient que les formes associées au «stubborn» avaient en guise d'enveloppe

cellulaire une simple membrane du type unitaire, épaisse de 100 Å environ, comme le montre la figure K de la planche, alors que les formes du «greening» avaient une enveloppe de 200 à 250 Å d'épaisseur (BOVE, 1971 ; SAGLIO et al., 1971). Au même moment notre équipe réussissait la culture de l'organisme associé au «stubborn», *Spiroplasma citri*, et démontrait qu'il s'agissait bien d'un mollicute (BEBEAR et al., 1974). La culture de l'organisme du «greening» n'a pas encore été obtenue à ce jour. Mais au fil des années nous n'avons cessé d'attirer l'attention sur le fait qu'avec une enveloppe de 250 Å l'organisme du «greening» ne pouvait pas être un mycoplasme (BOVE et SAGLIO, 1974 ; GARNIER et al., 1976), tant dans le cas du greening d'Afrique australe et de l'île de la Réunion, que dans celui des autres formes du «greening» : «Citrus decline» de l'Inde, «Citrus leaf mottling» des Philippines, «Likubin» de Taïwan, «Yellow shoot» de Chine, etc...

En microscopie électronique l'enveloppe de l'organisme associé au «greening» apparaît comme un triple feuillet totalisant 250 Å d'épaisseur et où, le plus souvent, le feuillet sombre externe et le feuillet sombre interne, restent parallèles, séparés par le feuillet clair médian. Mais dans certains cas on observe que le feuillet externe se détache du feuillet médian et qu'il prend même un aspect onduleux. Les cas les plus intéressants sont ceux où les deux feuillets,

* - Laboratoire de Biologie cellulaire et moléculaire, INRA et Université de Bordeaux II - 33140 Pont de la Maye (Gironde) France

externe et interne, se séparent nettement, la cellule offrant alors un aspect de plasmolyse (GARNIER et al., 1976).

Nous venons maintenant d'observer que le feuillet externe comme le feuillet interne ont une structure trilamellaire, donc la structure de membranes unitaires. En outre nous avons obtenu pour la première fois l'indication que la couche interne de la membrane externe est parfois plus épaisse et qu'elle n'est pas sans rappeler la couche à peptidoglycane des bactéries à Gram négatif. Ces observations apportent un argument supplémentaire pour exclure de la classe des Mollicutes l'organisme associé à la maladie du «greening» des agrumes.

MATÉRIEL ET MÉTHODES.

Matériel végétal.

Les nervures foliaires pour l'observation des structures associées au «greening» ont été prélevées sur les plants suivants :

1) oranger [*Citrus sinensis* (L.) OSB.] var. «Hamlin», auquel la maladie du «greening» (souche «Poona», Inde) a été inoculée au moyen de *Trioza erytrae*, DEL GUERCIO (MASSONIE et al., 1976).

2) oranger «Hamlin» atteint du «greening» de Taïwan (Likubin) (GARNIER et al., 1976).

Pour la comparaison de l'organisme du «greening» avec un véritable mycoplasme, nous avons utilisé des feuilles de pervenches (*Vinca rosea* L.) infectées par *Spiroplasma citri*, souche israélienne. La souche de pervenche infectée nous a été fournie par M. DANIELS, John Innes Institute, Norwich, England ; nous le remercions vivement.

Préparation des échantillons foliaires pour la microscopie électronique.

Deux types de fixation ont été utilisés :

1) Fixation classique.

Les fragments de la nervure médiane de feuilles sont fixés par le glutaraldéhyde à 6 p. cent dans le tampon cacodylate 0,1 M à pH 7,5 puis post-fixés par l'acide osmique à 1 p. cent dans du tampon phosphate 0,1 M à pH 7,5. Les échantillons déshydratés à l'alcool sont inclus dans de l'épon 812. Les coupes ultrafines sont colorées par le citrate de plomb, et observées au microscope électronique Siemens Elmiskop 101.

2) Fixation permettant la mise en évidence de la structure trilamellaire de la membrane unitaire.

Les fragments de nervure sont fixés par le glutaraldéhyde à 6 p. cent dans le tampon cacodylate 0,1 M à pH 7,5 puis

par l'acide osmique à 1 p. cent dans le même tampon. Les échantillons sont ensuite transférés pendant 6 à 12 heures dans une solution aqueuse d'acétate d'uranyle à 1 p. cent. Le lavage et la déshydratation doivent être réalisés en moins de 30 mn. L'inclusion se fait dans l'épon 812. Les coupes qui doivent être très fines (moins de 500 Å) sont contrastées par l'acétate d'uranyle à 2 p. cent dans l'eau puis par le citrate de Pb à 50 p. cent.

RÉSULTATS.

Les organismes associés à la maladie du «greening» observés après une fixation classique montrent un complexe membranaire d'environ 250 Å (figure A) composé de deux feuillets qui dans certains cas peuvent se séparer (figures B et C). Cependant ce type de fixation ne permet pas de distinguer la structure de ces deux feuillets.

Nous avons appliqué à ce matériel une technique permettant une bonne mise en évidence de la structure trilamellaire des membranes de type unitaire.

Les figures D, E, F, I et J montrent nettement que le feuillet interne (m.i.) a une structure trilamellaire, en accord avec l'idée que ce feuillet constitue dès lors la membrane cytoplasmique de l'organisme. Mais les figures D, E, F, G, I et J indiquent non moins clairement que le feuillet externe (m.e.) possède lui aussi une structure trilamellaire, et qu'il doit par conséquent être assimilé à une membrane externe.

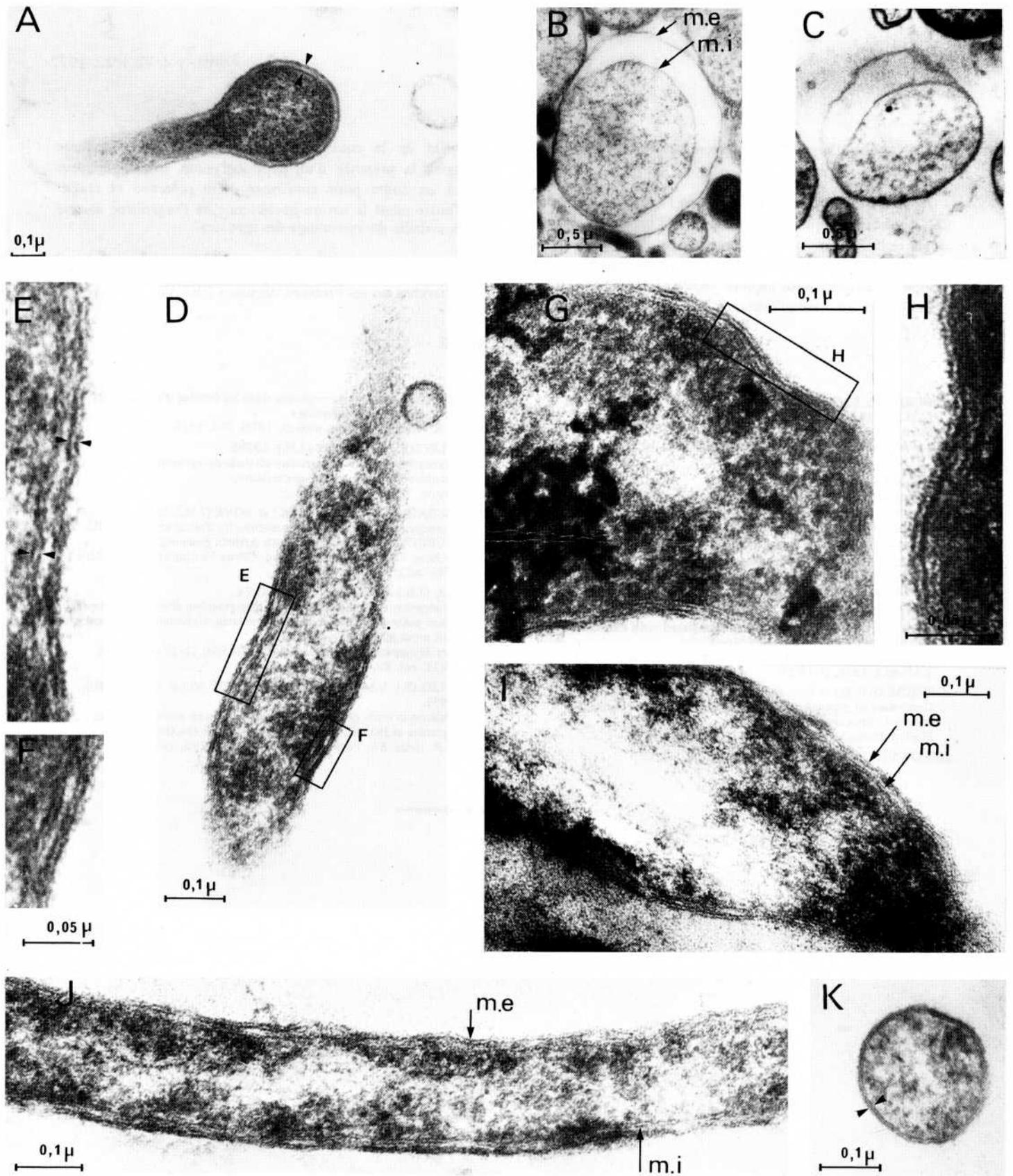
Dans plusieurs cas nous avons observé que la couche interne de la membrane externe est plus sombre et plus épaisse que la couche externe dont elle est séparée par une couche médiane claire, d'épaisseur constante. Les figures G et H illustrent une telle situation. L'aspect de cette couche interne épaisse rappelle celui décrit chez les bactéries à Gram négatif où la plus grande épaisseur de cette couche est due à la présence de peptidoglycane.

Enfin on constate souvent la présence de «projection» à la surface de la membrane externe (figures G et H).

DISCUSSION ET CONCLUSION.

Plusieurs critères doivent être remplis pour qu'un organisme procaryote puisse être considéré comme un mollicute. L'un de ces critères porte sur la nature de l'enveloppe cellulaire : celle-ci se réduit chez tous les mycoplasmes à une simple membrane de type unitaire, dépourvue de peptidoglycane et épaisse d'environ 100 Å (figure K).

L'enveloppe de l'organisme associé au «greening» des agrumes à une épaisseur de 200 à 250 Å incompatible avec celle d'une membrane unitaire. C'est la raison pour laquelle nous avons souligné à plusieurs reprises (voir GARNIER et



LÉGENDE DES FIGURES DE LA PLANCHE

A, B et C : organismes associés au "greening" de Taïwan (Likubin) observés après une fixation classique.

A : l'épaisseur de l'enveloppe est de 250 Å; les feuilletts sombres interne et externe sont équidistants; comparer A à K.

B et C : noter la séparation des deux feuilletts.

D à J : organismes associés au "greening" de l'Inde observés après une fixation particulière (voir "Matériels et Méthodes"). Noter la structure trilamellaire des feuilletts externe et interne.

K : coupe transversale à travers *Spiroplasma citri* dont l'enveloppe est constituée d'une seule membrane de type unitaire, épaisse de 100 Å et dont on peut observer la structure trilamellaire.

al., 1976) que l'organisme du greening ne pouvait pas être un mollicute.

Nous avons montré maintenant que l'épaisseur d'environ 250 Å caractéristique de l'enveloppe de l'organisme associé au «greening» provient de la présence de deux membranes de type unitaire : une membrane cytoplasmique et une membrane externe pour laquelle MOLL et MARTIN (1974) avaient déjà eu quelque évidence. En outre la plus grande

densité de la couche interne de la membrane externe suggère la présence d'un peptidoglycane. Des expériences sont en cours pour confirmer cette présence et établir définitivement la nature bactérienne de l'organisme associé à la maladie du «greening» des agrumes.

Ce travail a bénéficié d'une subvention de l'Institut de Recherches sur les Fruits et Agrumes (IRFA).

BIBLIOGRAPHIE.

- BEBEAR (C.), LATRILLE (J.), FLECK (J.), ROY (B.) et BOVE (J.M.). 1974.
Spiroplasma citri : un mollicute.
Les Mycoplasmes/Mycoplasmas. INSERM, 11-17 septembre 1974, vol. 33, p. 35-42.
- BOVE (J.M.). 1971.
 Mycoplasmes et microorganismes associés à diverses maladies des agrumes.
Symp. Intern. de Phytopathologie, New-Delhi (Inde), janvier 1971.
- BOVE (J.M.) et SAGLIO (P.). 1974.
 Stubborn and greening : a review 1969-1972.
in Proc. 6th Conf. Intern. Organ. Citrus Virologists (L.G. WEATHERS and M. COHEN, ed.), Univ. California Press, 1974, pp. 1-11.
- GARNIER (M.), LATRILLE (J.) et BOVE (J.M.). 1976.
Spiroplasma citri and the organism associated with likubin : comparison of their envelope systems.
in Proc. 7th Conf. Intern. Organ. Citrus Virologists (E.C. CALAVAN ed.), 1976, p. 13-17.
- IGWEGBE (E.C.K.) et CALAVAN (E.C.). 1970.
 Occurrence of mycoplasma-like bodies in phloem of stubborn infected citrus seedlings.
Phytopathology, 1970, 60, 1525-1526.
- LAFLECHE (D.) et BOVE (J.M.). 1970a.
 Structure de type mycoplasme dans les feuilles d'orangers atteints de la maladie du «greening».
C.R. Acad. Sci., Paris, série D, 1970, 270, 1915-1917.
- LAFLECHE (D.) et BOVE (J.M.). 1970b.
 Mycoplasmes dans les agrumes atteints de «greening», de «stubborn» ou de maladies similaires.
Fruits, 1970, 25, 455-465.
- MASSONIE (G.), GARNIER (M.) et BOVE (J.M.). 1976.
 Transmission of Indian citrus decline by *Trioza erythrae* (DEL GUERCIO), the vector of South African greening.
in Proc. 7th Conf. Intern. Organ. Citrus Virologists (E.C. CALAVAN ed.), 1976, p. 18-20.
- MOLL (J.N.) et MARTIN (M.M.). 1974.
 Comparison of the organism causing greening disease with several plant pathogenic Gram negative bacteria, rickettsia-like organisms and mycoplasma-like organisms.
Les Mycoplasmes/Mycoplasmas. INSERM, 11-17 septembre 1974, vol. 33, p. 89-96.
- SAGLIO (P.), LAFLECHE (D.), BONISSOL (C.) et BOVE (J.M.). 1971.
 Culture *in vitro* des mycoplasmes associés au «stubborn» des agrumes et leur observation au microscope électronique.
C.R. Acad. Sc., Paris série D, 272, 1387-1390, 1971.