

## Recherches sur la maladie du stubborn des agrumes.

*La revue FRUITS commence dans ce numéro la publication d'une série d'articles sur des recherches nouvelles concernant la maladie du stubborn au Maroc.*

*La maladie du stubborn est de loin celle qui pose le plus de problèmes non seulement au Maroc, dans le Bassin méditerranéen et le proche Orient, mais aussi en Californie et en Arizona. Il y a exactement trente ans, cette année, que la maladie a été rencontrée pour la première fois au Maroc, mais elle y existe très certainement depuis beaucoup plus longtemps. Pendant vingt ans, de 1949 à 1969, les travaux consacrés au stubborn au Maroc ont porté essentiellement sur l'observation de symptômes et la description des variétés et espèces sensibles. C'est à cette époque que Henri CHAPOT, décédé en 1975, n'a cessé d'attirer l'attention sur l'importance de la maladie et la possibilité de sa transmission par vecteur. Il faut souligner ici le mérite qu'il a eu de sensibiliser l'opinion sur la gravité du problème. A la même époque les chercheurs californiens, parmi lesquels il faut citer en tout premier lieu E.C. CALAVAN, montraient que le stubborn était une maladie transmissible par greffage d'inoculation, donc infectieuse. Sur la base de ces données il était généralement admis que l'agent causal de la maladie était un virus.*

*A partir de 1969 une ère nouvelle a commencé dans l'étude du stubborn. En effet en 1967 une équipe japonaise découvre chez les végétaux atteints de maladies du type jaunisse, la présence non pas de virus mais de mycoplasmes. Alors que les virus sont des nucléoprotéines, donc des éléments pathogènes non vivants, les mycoplasmes sont au contraire des cellules vivantes. Dès 1970 il est établi que des microorganismes de ce type sont présents dans les orangers atteints de stubborn. A partir de là les progrès concernant l'étude du mycoplasme du stubborn vont être très rapides. Le premier article de cette série retrace rapidement les événements qui ont conduit à la découverte, à la mise en culture et à la caractérisation du mycoplasme pathogène des agrumes : Spiroplasma citri. Ces travaux ont été pour une grande partie effectués au moyen d'une souche de S. citri provenant du Maroc. Il n'est pas inutile de rappeler ici l'origine de cette souche. En 1969 le Maroc avait été très alarmé par certaines affirmations suivant lesquelles la tristezza avait envahi le pays. On sait que la tristezza est une*

*grave maladie à virus des agrumes qui est transmise par certains pucerons, en particulier Aphis gossypii pour la Méditerranée, et qui affecte très sérieusement la plupart des agrumes greffés sur bigaradier. Cette maladie se propage en Espagne depuis 1956 et elle y fait de très importants dégâts. On conçoit aisément la crainte des autorités marocaines de voir la tristezza infecter le Maroc. L'une des régions où la maladie était supposée être présente, était le Tadla et plus particulièrement le verger d'orangers Washington Navel de M. GONTARD. L'un des arbres de ce verger, l'arbre n° 2 du rang 8 (arbre R8A2) âgé de vingt-huit ans, avait été décrit comme étant particulièrement atteint, si positivement atteint par la tristezza qu'il était inutile, disait-on, de s'en assurer par indexation sur lime mexicaine, la plante indicatrice de la tristezza. En visitant ce verger, fin 1969, j'ai été immédiatement frappé par le nombre important des arbres qui manifestaient un faciès «stubborn». Certains arbres étaient très atteints, d'autres moyennement, d'autres encore plus faiblement. En fait, l'arbre R8A2 incriminé était l'un de ceux qui manifestaient les symptômes les plus sévères de stubborn. En particulier il montrait le symptôme «trou d'épingle» («pinholing»), «honeycombing» ou «inverse stem pitting» des auteurs anglo-saxons) sur la face interne de l'écorce du bigaradier-porte-greffe, prélevée immédiatement en dessous de la ligne de greffe. Ce symptôme sur écorce de bigaradier n'est pas spécifique du stubborn ; il est aussi observé chez les arbres atteints de tristezza. C'est l'une des raisons pour lesquelles l'arbre R8A2 avait été diagnostiqué, à tort, comme étant atteint de tristezza. Dans les mois qui ont suivi nous avons réalisé l'indexation sur lime mexicaine de tous ces arbres : tous les tests ont été négatifs ; aucun des arbres n'était donc atteint de tristezza. Nous avons aussi indexé neuf de ces arbres, et en particulier les arbres R8A2 et R7A10, sur orangers Madame Vinous (VOGEL et BOVÉ 1974). L'indexation a révélé qu'ils étaient tous contaminés par l'agent du stubborn ; en outre, les plants d'orangers Madame Vinous inoculés avec du matériel végétal, provenant respectivement de l'arbre R8A2 et R7A10, ont permis l'isolement de la souche de Spiroplasma citri «R8A2» et «R7A10».*

*La nécessité de prendre en considération la maladie du stubborn des agrumes vient non seulement de la gravité des symptômes et de la réduction de rendement qu'elle entraîne*

(récemment plusieurs vergers ont dû être arrachés dans le Tadla à cause de leur improduction imputable au stubborn), mais aussi parce que la maladie est transmise par insecte (s) vecteurs (s) et plus précisément par cicadelle (s). Dès lors le risque est grand que des plants de pépinières, même produits à partir de matériel végétal sain, soient recontaminés plus ou moins rapidement par l'agent du stubborn. Par ailleurs, le verger agrumicole marocain est vieux : l'âge moyen des arbres est de trente ans environ. Le fait de ne pas le régénérer revient véritablement à entamer le capital agrumes du pays. Mais cette régénération indispensable implique la création de pépinières importantes de plants sains. On comprend aisément que la mise en place de telles pépinières doit se faire à l'abri d'une contamination éventuelle des jeunes plants par l'agent du stubborn. En effet, au cours des dernières années, tant en agrumiculture qu'en arboriculture fruitière, une observation importante a été faite : c'est la constatation que la lutte contre les maladies de dégénérescence passe avant tout par la plantation en vergers de plants sains. Utiliser, pour la plantation, des arbres déjà malades à la sortie de la pépinière, c'est très gravement compromettre l'avenir du nouveau verger.

Pour toutes ces raisons et avant la mise en place de pépinières importantes, il était essentiel : 1) de savoir si l'agent de la maladie du stubborn était transmis activement au Maroc, 2) d'identifier, le cas échéant, l'insecte vecteur et 3) de mettre en oeuvre la lutte contre le vecteur identifié.

A l'occasion d'une mission au Maroc dans le cadre de l'Association des Producteurs d'Agrumes du Maroc (ASPAM) Colette BOVÉ, qui m'accompagnait, a trouvé à Rabat une pervenche (*Vinca rosea* L.) suspecte qui, examinée à Bordeaux par Monique GARNIER et Jean-Claude VIGNAULT, s'est révélée être contaminée par *Spiroplasma citri* (BOVÉ et al., 1978). Cette observation montrait, d'une façon indiscutable pour la première fois, que l'agent du stubborn était véhiculé par vecteur. A la suite de cette découverte une expérimentation a été mise en place dans le Tadla en collaboration avec Ahmed NHAMI (SODEA). Cette expérience décrite dans l'un des articles de cette série, démontre l'intensité de la transmission naturelle de *S. citri*, dans la région du Tadla tout au moins.

La transmission naturelle étant établie, il convenait d'identifier les vecteurs impliqués. En Californie ce sont les cicadelles appartenant aux trois espèces suivantes qui transmettent l'agent de la maladie : *Neoaliturus* (ex *Circulifer) tenellus* (BAKER), *Scaphytopius nitridus* (DELONG) et *Scaphytopius acutus delongi* (SAY). Il convenait donc de vérifier si, au Maroc comme en Californie, certaines cicadelles étaient impliquées dans la transmission. L'une des conditions nécessaires, mais non suffisante, pour qu'une cicadelle donnée soit vecteur c'est qu'elle héberge *S. citri*. La recherche de *S. citri* dans les cicadelles, comme d'ailleurs dans les plantes, a bénéficié de deux approches. L'une est basée sur le fait qu'il est possible de cultiver le spiroplasma (beaucoup de mycoplasmes végétaux n'ont pas encore pu être cultivés) et donc de le cultiver en particulier à partir de cicadelles ; l'obtention d'une culture de spiroplasma à

partir d'un broyat de cicadelles prouvera que ces dernières hébergent le spiroplasma ; cette technique a été utilisée pour la première fois en Californie par LEE (1973). La deuxième approche est basée sur l'utilisation d'une technique immuno-enzymatique très sensible, la technique ELISA, que nous avons adaptée les premiers à la recherche de *S. citri* dans divers spécimens suspects (SAILLARD et al., 1978). Ces méthodes peuvent dès lors être appliquées aux cicadelles capturées dans les vergers d'agrumes, soit sur la flore herbacée de ces vergers, soit sur les agrumes eux-mêmes ; elles peuvent aussi être appliquées aux plantes pouvant héberger *S. citri*. On conçoit qu'il est important de connaître la flore des vergers, d'une part parce qu'elle peut conditionner la nature des cicadelles présentes, d'autre part parce que des plants autres que les agrumes peuvent héberger *S. citri*. Par ailleurs l'identification des cicadelles rencontrées est évidemment primordiale. Dans les articles qui vont suivre, les travaux concernant l'identification des cicadelles (MOUTOUS et al., 1979) et la description de la flore des vergers (VIENNOT-BOURGIN et al., 1979) précéderont ceux relatifs à l'identification des cicadelles et des plantes trouvées positives au test ELISA et à l'essai de mise en culture (SAILLARD et al., 1979).

La pervenche s'est révélée être une excellente plante indicatrice pour la détection d'une transmission naturelle de *S. citri*. L'un des articles de la série portera sur la description des diverses maladies à virus, à mycoplasme et à *S. citri* qui peuvent affecter la pervenche (NHAMI et al., 1979). L'ensemble de ces résultats a déjà fait l'objet de communications préliminaires (BOVÉ et al., 1979 a et b).

Ces recherches nouvelles sur la maladie du stubborn au Maroc ne pourraient se faire sans la collaboration étroite et confiante entre, d'une part pour le Maroc : la Société de Développement agricole (SODEA) et l'Institut agronomique et vétérinaire Hassan II, et d'autre part pour la France : l'Université de Bordeaux II et l'Institut national de la Recherche agronomique (INRA). Cette collaboration est officialisée par une convention qui lie les divers organismes.

Je voudrais terminer sur les considérations suivantes : Au cours des dix dernières années des moyens et des efforts importants ont été consacrés à l'étude de la maladie du stubborn et de son agent causal, *Spiroplasma citri*. Il s'agit de recherches fondamentales. Sans cette recherche de base il n'y aurait pas, aujourd'hui, d'application possible ni d'espoir de trouver des moyens de lutte. Inversement, l'étude de la maladie du stubborn, considérée comme un problème de pathologie appliquée, a conduit à la découverte d'un microorganisme nouveau et a alimenté la recherche fondamentale. C'est le va-et-vient incessant entre les aspects fondamentaux et les aspects appliqués qu'il convient de favoriser.

J.M. BOVÉ

- BOVE (J.M.), VIGNAULT (J.C.), GARNIER (M.), SAILLARD (C.), GARCIA-JURADO (O.), BOVE (C.) et NHAMI (A.). 1978.  
*C.R. Hebd. Seances Acad. Sci. Ser. D*, 286, 57-59.
- BOVE (J.M.), MOUTOUS (G.), SAILLARD (C.), FOS (A.), BONFILS (J.), VIGNAULT (J.C.), NHAMI (A.), ABASSI (M.), KABBAGE (K.), HAFIDI (B.), MOUCHES (C.) et VIENNOT-BOURGIN (G.). 1979 a.  
*C.R. Hebd. Seances Acad. Sci. Ser. D*, 288, 335-338.
- BOVE (J.M.), NHAMI (A.), SAILLARD (C.), VIGNAULT (J.C.), MOUCHES (C.), GARNIER (M.), MOUTOUS (G.), FOS (A.), BONFILS (J.), ABASSI (M.), KABBAGE (K.), HAFIDI (B.) et VIENNOT-BOURGIN (G.). 1979 b.  
*C.R. Hebd. Seances Acad. Sci. Ser. D*, 288, 399-402.
- LEE (I.M.), CARTIA (G.), CALAVAN (E.C.) et KALOOSTIAN (G.H.). 1973.  
*Calif. Agric.*, 27 (II), 14-15.
- MOUTOUS (G.), FOS (A.), BONFILS (J.), NHAMI (A.), ABASSI (M.), KABBAGE (K.), SAILLARD (C.), VIGNAULT (J.C.), HAFIDI (B.), MOUCHES (C.), VIENNOT-BOURGIN (G.) et BOVE (J.M.). 1979.  
A paraître dans Fruits.
- NHAMI (A.), BOVE (J.M.), GARNIER (M.), BOVE (C.), MOUCHES (C.), SAILLARD (C.), VIGNAULT (J.C.), MOUTOUS (G.), FOS (A.) et VIENNOT-BOURGIN (G.). 1979.  
A paraître dans Fruits.
- SAILLARD (C.), DUNEZ (J.), GARCIA-JURADO (G.), NHAMI (A.), et BOVE (J.M.). 1978.  
*C.R. Hebd. Seances Acad. Sci. Ser. D*, 286, 1245-1248.
- SAILLARD (C.), VIGNAULT (J.C.), BOVE (J.M.), MOUTOUS (G.), FOS (A.), MOUCHES (C.), BONFILS (J.), HAFIDI (B.), NHAMI (A.), KABBAGE (K.) et VIENNOT-BOURGIN (G.). 1979.  
A paraître dans Fruits.
- VIENNOT-BOURGIN (G.), FOS (A.), MOUTOUS (G.), BONFILS (J.), SAILLARD (C.), VIGNAULT (J.C.), NHAMI (A.) et BOVE (J.M.). 1979.  
A paraître dans Fruits.



## RECHERCHES SUR LA MALADIE DU STUBBORN DES AGRUMES.

# I - Découverte et propriétés de *Spiroplasma citri*, le mycoplasme responsable de la maladie du stubborn des agrumes : un historique.

J.M. BOVÉ \*

RECHERCHES SUR LA MALADIE DU STUBBORN DES AGRUMES

I.- DECOUVERTE ET PROPRIÉTÉS DE *SPIROPLASMA CITRI*,  
LE MYCOPLASME RESPONSABLE DE LA MALADIE  
DU STUBBORN DES AGRUMES : UN HISTORIQUE.

J.M. BOVÉ

*Fruits*, avril 1979, vol. 34, n°4, p. 263-281.

RESUME - Description et historique des travaux qui ont conduit à l'isolement, à la culture et à la caractérisation du premier mycoplasme d'origine végétale : *Spiroplasma citri*, et à la démonstration que ce mycoplasme spiralé était l'agent causal de la maladie du stubborn des agrumes. Définition et propriétés des mycoplasmes en prenant comme exemple *S. citri* : 1) propriétés que cet organisme partage avec les autres mycoplasmes et 2) propriétés particulières de *S. citri*. Les spiroplasmes : un nouveau groupe d'agents pathogènes des végétaux, des insectes et des animaux.

### INTRODUCTION: DES MYCOPLASMES AUX SPIROPLASMES

Les mycoplasmes : agents pathogènes de l'homme et des animaux ; leur mise en évidence chez les végétaux et leur présence chez les agrumes.

Les premières études sur les mycoplasmes datent de la fin du siècle dernier lorsque NOCARD et ROUX (1898) caractérisent l'agent causal de la péripneumonie des bovidés et le décrivent comme un «microbe d'une extrême ténuité dont les dimensions très inférieures à celles des plus petits microbes connus, ne permettent pas, même après coloration, d'en déterminer exactement la forme». L'organisme est connu aujourd'hui sous le nom de *Mycoplasma mycoides*.

En 1937 des organismes pléiomorphes du même type que ceux de la péripneumonie sont découverts chez l'homme par DIENES et EDSALL (1937) ; leur rôle pathogène dans la pneumonie atypique primitive de l'homme est confirmé en 1962 (CHANOCK et al., 1962) ; l'agent causal est *Mycoplasma pneumoniae*.

Chez les végétaux, ce n'est qu'en 1967, au Japon, que des formes ressemblant à des mycoplasmes ont été mises en évidence (DOI et al., 1967). Il s'agissait de plantes atteintes de maladies du type «jaunisse». Depuis, le nombre des maladies dans lesquelles les formes mycoplasmiques ont été observées atteint plus d'une centaine et leur répartition géographique est mondiale. Certaines de ces maladies sont graves et représentent un obstacle sérieux pour la production agricole.

Dans toutes ces maladies, les formes mycoplasmiques sont essentiellement localisées dans les tubes criblés où

\* - Professeur à l'Université de Bordeaux II, Directeur de Recherches à l'INRA, Laboratoire de Biologie cellulaire et moléculaire, Domaine de la Grande Ferrade, INRA, 33140 PONT DE LA MAYE (France)

circule la sève élaborée. C'est la similitude morphologique entre les formes observées dans les tubes criblés d'une part, et les véritables mycoplasmes tels qu'ils apparaissent chez les animaux d'autre part, qui est à l'origine de l'hypothèse «mycoplasme» quant à l'étiologie des maladies de type jaunisse.

La seule similitude morphologique n'était évidemment pas suffisante pour affirmer la nature mycoplasmiq ue des formes végétales. D'autres critères étaient nécessaires. Pour cela il paraissait important d'obtenir ces formes végétales en culture pure. C'est dans ce contexte qu'en 1971 notre équipe a réussi à cultiver une de ces formes mycoplasmiq ues et, plus précisément, celle responsable du «stubborn» des agrumes (SAGLIO et al., 1971 a). Il n'est peut-être pas inutile de rappeler ici les raisons principales de cette réussite.

Nous avons abordé le problème de la culture des mycoplasmes au début de 1970 dans le cadre de nos recherches sur les maladies des agrumes. Nous venions en effet de mettre en évidence pour la première fois chez les agrumes la présence de «structures» dans les tubes criblés d'orangers (*Citrus sinensis* L., OSB.) atteints par la maladie du «greening» (LAFLÈCHE et BOVÉ, 1970 a) (planche 1). Cette maladie est ainsi appelée parce que les fruits se colorent mal et restent verts. Peu de temps après, des formes mycoplasmiq ues étaient observées en Californie dans le phloème d'orangers affectés par le «stubborn» ou maladie de l'entêtement des arbres à ne plus pousser (IGWEGBE et CALAVAN, 1970). Nous confirmions les travaux américains (planche 2), mais nous montrions en outre que les «structures» associées au greening étaient différentes de celles correspondant au stubborn (LAFLÈCHE et BOVÉ, 1970 b). Nous savons aujourd'hui que l'organisme du greening est de type bactérien et non pas de type mycoplasmiq ue (GARNIER et BOVÉ, 1977 et 1978 ; BOVÉ, 1978).

Nous disposions du matériel végétal sain et malade indispensable à ces études parce que, dans le cadre de l'organisation internationale des virologistes des agrumes nous avions entrepris en 1966, au phytotron de Gif-sur-Yvette, une étude comparative du «greening» et du «stubborn». Pour expliquer des observations contradictoires concernant les symptômes en plein champ, nous recherchions en particulier l'influence de la température sur l'expression des symptômes des deux maladies.

La température optimum pour l'expression des symptômes du «stubborn» est voisine de 32°C ; les formes mycoplasmiq ues y sont très nombreuses en particulier dans les très jeunes feuilles.

Dès 1969 nous avons établi que les symptômes du «stubborn» étaient les plus sévères sur les plants d'oranger maintenus à la température relativement élevée de 32°C ; ils étaient faibles à 24°C. Ces faits expliquent maintenant pourquoi les symptômes de la maladie sont sévères dans les régions chaudes comme le Maroc par exemple, alors qu'ils ne s'expriment pas dans les régions plus septentriona-

les (Corse). Pour le greening nous mettions en évidence deux types de souches, l'une manifestant d'excellents symptômes à 32°C, et dès lors «tolérante» à la chaleur, l'autre «sensible» et ne manifestant des symptômes qu'entre 20 et 25°C (BOVÉ et al., 1974). Il est intéressant de remarquer que les souches «tolérantes» sont celles présentes aux Indes, à l'île de la Réunion et à l'île Maurice, en Extrême Orient, dans le Sud-est Asiatique ; elles sont transmises par le psylle asiatique : *Diaphorina citri* KUW. ; les souches «sensibles» sont celles de l'Afrique australe ; elles ont pour vecteur le psylle africain : *Trioza erytrae* DEL GUERCIO.

C'est dans ce matériel végétal, cultivé dans les conditions les meilleures pour l'expression des symptômes, que nous mettions en évidence en 1970 les «structures» associées les unes au greening, les autres au stubborn. En outre il était aisé de montrer que les «structures» du stubborn étaient beaucoup plus nombreuses dans les plants d'orangers cultivés à 32°C que dans ceux élevés à 24°C. Enfin dans les plants à 32°C les très jeunes feuilles, longues d'un centimètre environ, étaient celles qui hébergeaient la population la plus importante de formes mycoplasmiq ues (LAFLÈCHE et BOVÉ, 1970 b).

Le mycoplasme associé au stubborn a été isolé de très petites feuilles des plants d'oranger cultivé à 32°C et sa mise en culture a été réussie précisément à la température optimum de 32°C.

Les résultats précédents ont immédiatement suggéré 1) d'utiliser, comme matériel de départ pour la mise en culture, des «formes» associées au «stubborn», les petites feuilles des plants malades cultivés à 32°C, et 2) d'effectuer la culture *in vitro* à la température de 32°C. C'est dans ces conditions que la mise en culture a été réussie pour l'agent du stubborn. Elle ne l'a pas été jusqu'à présent pour l'agent du greening. Signalons ici que vers la même époque l'équipe américaine de E.C. CALAVAN obtenait aussi la culture de l'agent du stubborn (FUDL-ALLAH et al., 1972).

L'organisme associé au stubborn des agrumes est un mycoplasme nouveau : c'est un spiroplasma (planche 4).

L'organisme du stubborn, ayant été obtenu en culture, il fallait que nous le caractérisions sur le plan biologique, biochimique et sérologique. Ce travail auquel nous avons fait participer délibérément plusieurs laboratoires étrangers pour la caractérisation sérologique en particulier, a été effectué entre 1971 et 1974 (BOVÉ et al., 1973 ; LATRILLE et al., 1973 ; SAGLIO et al., 1973 ; COLE et al., 1973 ; BEBEAR et al., 1974). Cette étude révélait que l'organisme associé au «stubborn» était bien un mycoplasme, car dépourvu de paroi à peptidoglycane, voire de nucléotide de Park (LATRILLE et al., 1973 ; BEBEAR et al., 1974) mais qu'il s'agissait d'un mycoplasme nouveau, insoupçonné jusque-là, sans relation sérologique aucune avec les mycoplasmes connus ; ce nouveau mycoplasme avait une morphologie spiralée et il était motile ! Cette morphologie était surprenante pour un procaryote sans paroi et dépourvu

Planche 1 - «FORMES» DE TYPE BACTÉRIEN DANS LES TUBES CIBLÉS DE JEUNES FEUILLES D'ORANGERS 'HAMLIN' ATTEINTS DE GREENING (SOUCHE PHILIPPINES) ET CULTIVÉS A 32°C.

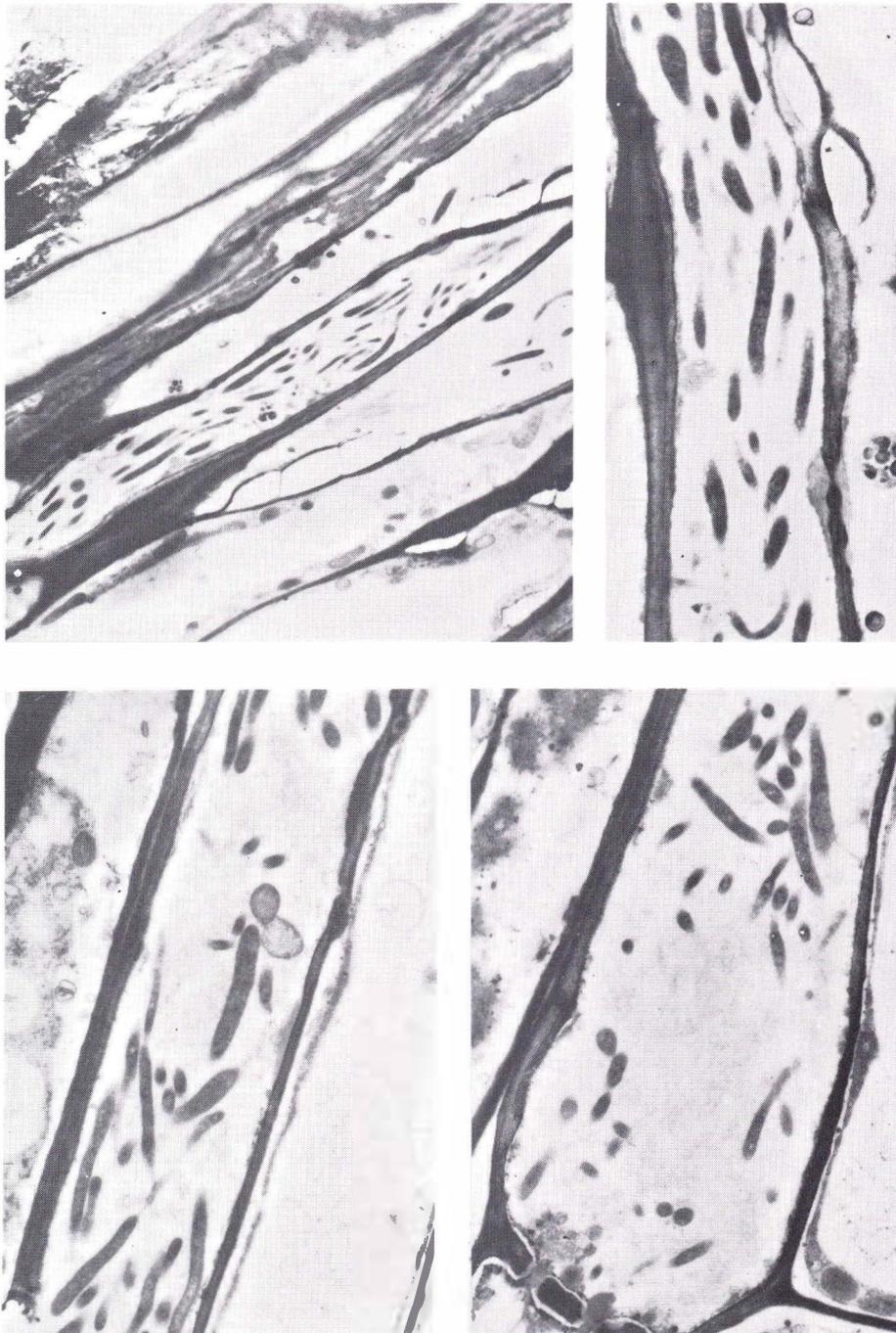


Planche 2 - *SPIROPLASMA CITRI* DANS LES TUBES CIBLÉS DE JEUNES FEUILLES D'ORANGERS ATTEINTS DE STUBBORN ET CULTIVÉS A 32°C.  
(noter l'aspect spiralé de l'organisme).

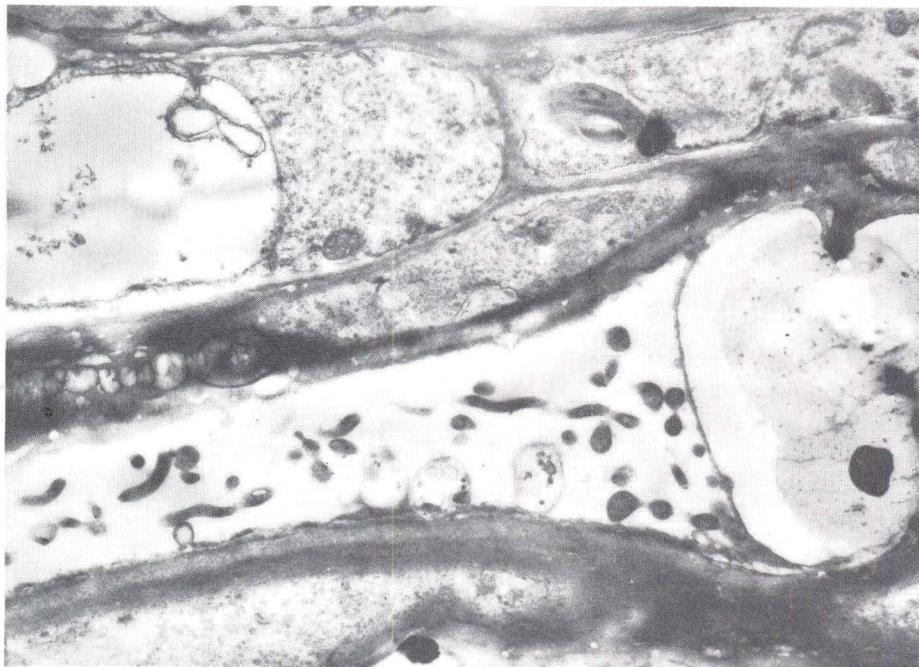
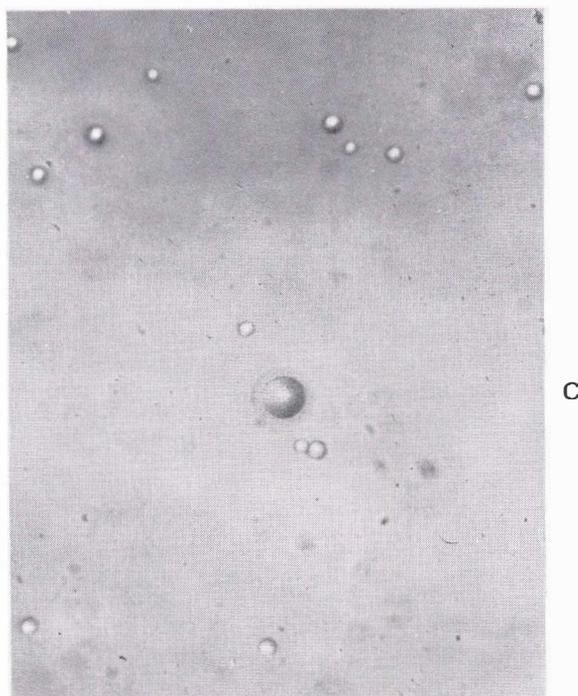
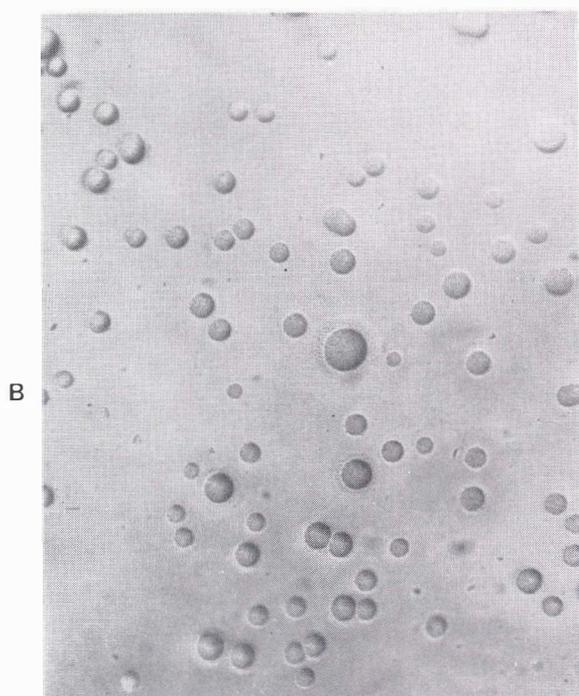
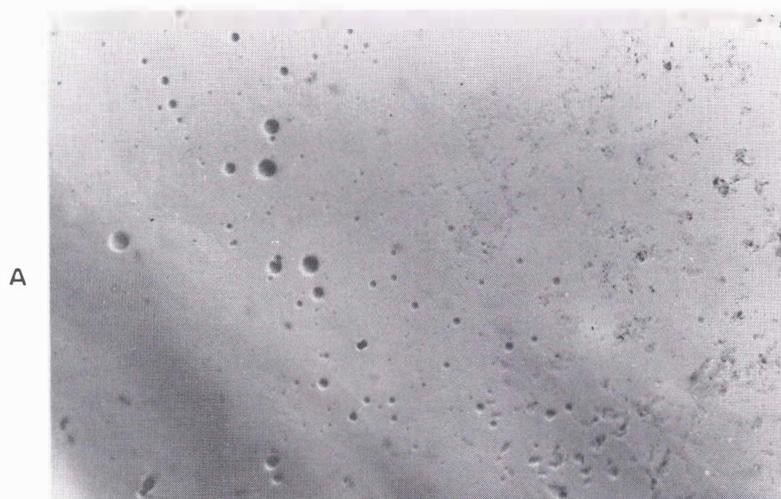


Planche 3 - *SPIROPLASMA CITRI* : COLONIES EN «OEUF SUR LE PLAT»

A : Primoculture, souche C 189 ; repiquages des souches marocaine R 8 A 2 (B) et californienne C 189 (C).



d'une structure du type «filament axial» caractéristique des spirochètes. A cause de cette particularité morphologique, l'organisme a été appelé *Spiroplasma* qui représentait un genre nouveau, et plus précisément *Spiroplasma citri*, espèce nouvelle, pour rappeler l'origine première de l'organisme : les citrus. *S. citri* est pour l'instant la seule espèce reconnue du genre *Spiroplasma*. Trois articles de revue donnent des précisions supplémentaires sur l'historique des travaux concernant *S. citri* et l'organisme du greening (BOVÉ et SAGLIO, 1974 ; BOVÉ, 1975 ; BOVÉ et SAILLARD, 1979).

#### SPIROPLASMA CITRI : PROPRIETES GENERALES

Nous avons étudié en parallèle essentiellement deux isollements de *S. citri*, l'un C 189, que nous avons obtenu à partir d'orangers dûs à l'obligeance de E.C. CALAVAN et infectés avec une souche de stubborn de Californie, l'autre, R8A2, correspondant à une souche de stubborn du Maroc. Ces deux isollements représenteraient deux souches très voisines; la seule différence biochimique que nous ayons détectée concerne la fermentation du glucose. L'une, celle d'origine marocaine (R8A2), fermente le glucose d'une façon active, l'autre (C189) très lentement. Les deux souches ont été déposées à l'American Type Culture Collection (ATCC) sous le numéro 27.556 pour la souche marocaine R8A2 qui constitue la souche de référence, et sous le numéro 27.665 pour la souche C189.

Les propriétés de *S. citri*, souche C189 ou R8A2, peuvent dès lors être très brièvement résumées dans les pages suivantes ; elles caractérisent l'organisme et permettent de la classer définitivement parmi les Mollicutes et non pas dans les Schizomycètes où sont classifiées les bactéries.

Propriétés partagées avec les mycoplasmes animaux connus en 1973.

*Besoin nutritif : nécessité de sérum.*

L'organisme se développe dans un milieu de culture classique pour mycoplasme (milieu «B») renfermant en particulier du sérum de poulain, mais dont la pression osmotique a été augmentée par l'addition de sorbitol et qui renferme en outre du glucose, du fructose et du saccharose (milieu BS). *S. citri* a un besoin absolu de sérum. Les éléments nutritifs indispensables apportés par le sérum sont le cholestérol et certains acides gras que *S. citri*, comme de nombreux autres mycoplasmes, ne sait pas synthétiser.

Le cholestérol, présent en faible quantité dans les végétaux, peut être remplacé par certains phytostérols (FREEMAN et al., 1976).

Par son besoin en cholestérol, *S. citri* ressemble aux espèces du genre *Mycoplasma* qui en ont besoin elles-aussi, alors que les représentants du genre *Acholeplasma* se développent en son absence.

*Colonies en «oeuf sur le plat».*

En milieu gélosé *S. citri* donne des colonies en «oeuf sur le plat» (planche 3). Ce type de colonie traduit l'absence de paroi et on l'obtient tant avec les mycoplasmes qu'avec les variants bactériens «L» dépourvus, eux aussi, de parois.

*Sensibilité à la tétracycline ; résistance à la pénicilline.*

Comme tous les mycoplasmes, *S. citri* est très sensible aux tétracyclines. D'ailleurs dès la découverte de formes mycoplasmiques dans les végétaux en 1967, le traitement des plantes malades par l'administration de tétracycline a immédiatement été essayé, et il s'est traduit par une rémission temporaire des symptômes (ISHIE et al., 1967). Il est aisé d'obtenir la disparition des symptômes en faisant absorber l'antibiotique par les racines, mais l'arrêt du traitement se traduit par leur réapparition. La figure 1 montre deux plants de pervenches (*Vinca rosea* L.) atteints de phyllodie, l'un traité par la tétracycline (à gauche), l'autre non traité. La figure 2 montre que si la tétracycline (T) agit, la pénicilline (P) n'a aucune action. Comme le stubborn, la phyllodie est une maladie de type mycoplasmique. Par contre la figure 3 montre que dans le cas du greening des agrumes où l'organisme associé est du type bactérien et non pas mycoplasmique, la pénicilline (+ P) est active ; la tétracycline aussi produit un effet positif (résultat non représenté sur la figure).

*S. citri* comme tous les mycoplasmes, est résistant à la pénicilline. Ce fait laissait pressentir l'absence de paroi à peptidoglycane. Cependant la forme spiralee de *S. citri* avait suggéré une relation possible avec les spirochètes donc avec les bactéries. Dès lors la recherche de peptidoglycane ou du nucléotide de Park, précurseur du peptidoglycane, s'imposait.

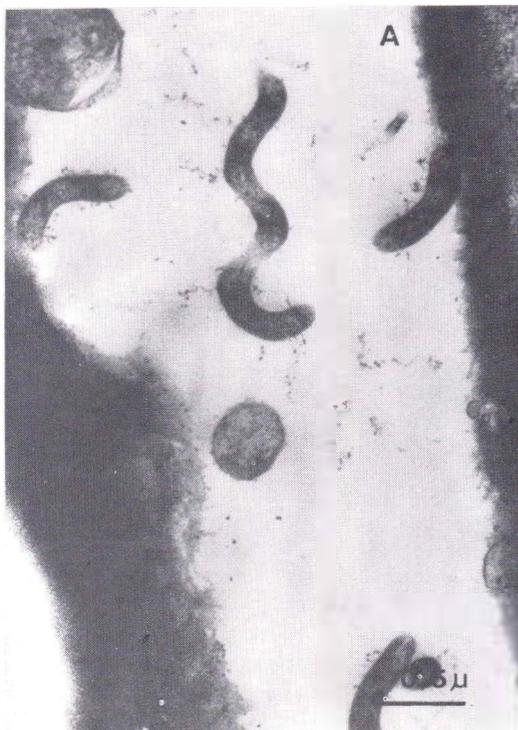
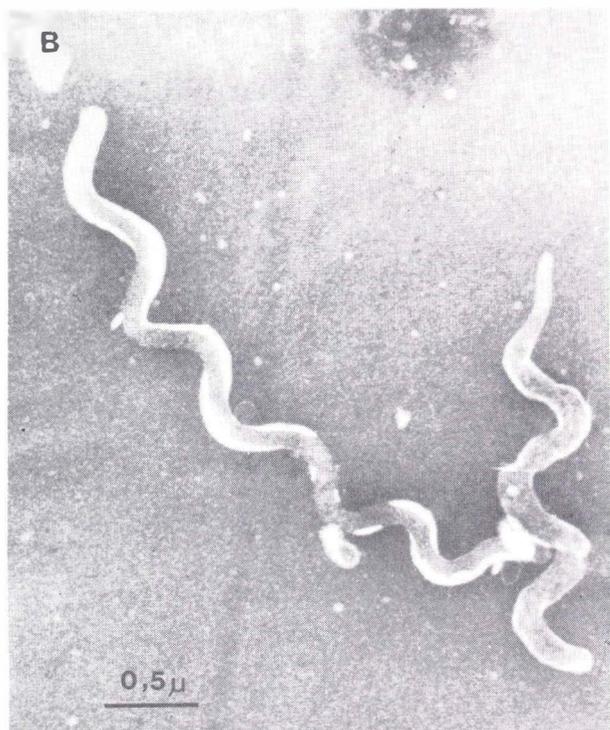
Absence de paroi à peptidoglycane et de précurseur de peptidoglycane (planche 9 M).

*Recherche des éléments constitutifs d'un peptidoglycane.*

Différentes méthodes ont été appliquées :

Nous avons utilisé dans un premier temps les techniques habituellement employées pour la mise en évidence de peptidoglycane chez les bactéries ou certains variants L par J. FLECK (Strasbourg) (FLECK et MOCK, 1971) avec laquelle nous avons collaboré pour la réalisation de ce travail. Des extraits ont été préparés à partir d'une culture de trois litres de *S. citri*. Les organismes sédimentés ont été lysés par choc osmotique. Les éléments insolubles du lysat ont été lavés puis traités par de la ribonucléase et la trypsine avant d'être analysés (extrait «R.Nase-trypsine»). Parallèlement des témoins ont été préparés de la même manière : 1) une bactérie à Gram positif, *Sarcina lutea*, 2) une bactérie à Gram négatif, *Moraxella* sp., ainsi que 3) des sphéropastes d'*Escherichia coli* obtenus selon la méthode de CHARGAFF et al. (1957) et enfin 4) un autre Mollicute, *Acholeplasma laidlawii*.

Planche 4 - *SPIROPLASMA CITRI* : LE MYCOPLASME SPIRALÉ DE LA MALADIE DU STUBBORN DES AGRUMES  
*IN SITU* DANS LES TUBES CRIBLÉS (A) ET EN COLORATION NÉGATIVE APRES CULTURE *IN VITRO* (B).  
(Microscopie électronique).



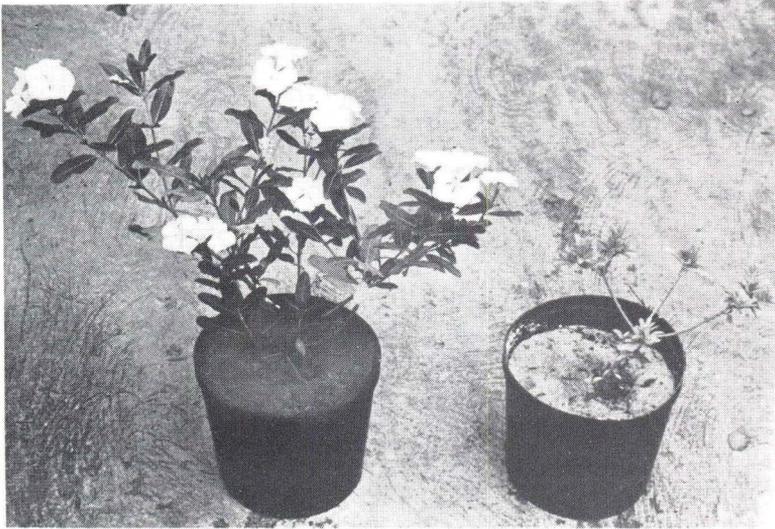


Figure 1 - Pervenches (*Vinca rosea* L.) atteintes de phyllodie traitée par la tétracycline (à gauche) et non traitée (à droite). La tétracycline agit sur les formes mycoplasmiques.



Figure 3 - Orangers 'Madame Vinous' atteints de greening. La pénicilline (+ P) agit sur les formes bactériennes associées au greening.

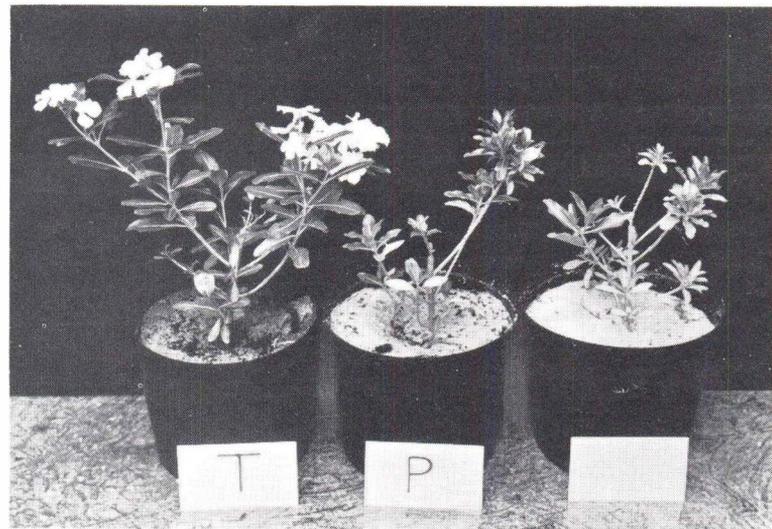


Figure 2 - Pervenches (*Vinca rosea* L.) atteintes de phyllodie traitée par la pénicilline (P) ou la tétracycline (T) et non traitée.

La pénicilline n'agit pas sur les formes mycoplasmiques.

Un deuxième type de préparation a été réalisé. Les microorganismes ont été sédimentés puis lysés par choc osmotique. Les éléments insolubles du lysat ont été traités par de la désoxyribonucléase, sans traitement par la trypsine (extraits «DNase»). *S. lutea* a été utilisée comme témoin. Cette technique avait été employée par RAZIN pour étudier les enveloppes de *S. citri* (RAZIN et al., 1973).

Plusieurs déterminations ont été réalisées sur ces différents extraits.

- Etude de la composition en acides aminés. La composition en acides aminés de l'extrait «RNase-trypsine» a été étudiée par chromatographie sur résine échangeuse d'ions (passage sur analyseur automatique d'acides aminés UNICHROM) après hydrolyse par HCl 6 N à 110°C pendant seize heures.

Les profils d'éluion obtenus à partir des hydrolysats de *S. citri* et des différents témoins utilisés montrent que chez *S. citri* acide glutamique, alanine et lysine ne semblent pas exister en quantité prédominante comme c'est le cas pour le peptidoglycane d'une bactérie à Gram positif telle que *Sarcina lutea*. En outre, il n'a pas été trouvé chez *S. citri* d'acide diaminopimélique (DAP), caractéristique des parois des bactéries à Gram négatif (*Moraxella*). Cet acide aminé est cependant retrouvé à partir des sphéropastes d'*E. coli* montrant ainsi que la méthode est suffisamment sensible.

- Recherche d'hexosamines. Effectuée sur l'extrait «RNase-trypsine» après une hydrolyse plus douce (traitement par HCl 3 N à 95°C pendant quatre heures), suivant la micro-technique de GHUYSEN et al. (1966), utilisant le réactif d'ELSON-MORGAN, elle s'est avérée négative.

Sur les extraits «DNase», les hexosamines ont été recherchées d'une manière quantitative et qualitative. Le dosage effectué selon la technique du GHUYSEN et al. (1966) a permis de retrouver dans les extraits «DNase» de *S. citri* une quantité d'hexosamines égale à environ 10 µg par mg de protéines.

Afin de préciser la nature de ces hexosamines, les extraits «DNase» de *S. citri* (traités par HCl 3 N à 95°C pendant quatre heures) ont été passés sur l'analyseur automatique. La glucosamine a pu être mise en évidence mais on n'a pas trouvé d'acide muramique. Par contre, les extraits obtenus à partir de *S. lutea* possèdent acide muramique et glucosamine

- Action du lysozyme et du dodécylsulfate de sodium. L'action du lysozyme sur les extraits «RNase-trypsine» de *S. citri* n'a pas entraîné la libération de sucres réducteurs. Le traitement par le dodécylsulfate de sodium qui avait permis à J. FLECK d'isoler un peptidoglycane modifié à partir de formes L de *Proteus* n'a donné ici aucun résultat.

#### Recherche de nucléotides précurseurs du peptidoglycane.

L'absence d'acide diaminopimélique et d'acide muramique à des taux décelables par nos techniques, le fait que les acides aminés constituant habituellement le peptidoglycane des parois bactériennes ne soient pas retrouvés de façon pré-

dominante, plaident déjà en faveur de l'exclusion de *S. citri* de la classe des Schizomycètes. Pour confirmer ce fait il restait à éliminer chez *S. citri* l'existence de précurseurs d'une paroi de type bactérien. Pour cela nous avons recherché si *S. citri* possédait des nucléotides précurseurs du peptidoglycane.

L'extraction de ces nucléotides a été réalisée selon la technique de STROMINGER (1957) en traitant les cellules obtenues à partir de trois litres de culture par de l'acide trichloracétique à 10 p. 100. Deux témoins ont été utilisés un témoin positif, *Sarcina lutea*, et un témoin négatif, *Acholeplasma laidlawii*.

Les nucléotides précurseurs (UDP-N-acétylmuramyl pentapeptide) ont été recherchés sur le matériel ainsi solubilisé par chromatographie sur plaque de cellulose. La plaque a été révélée par les réactifs suivants : ninhydrine, réactif d'ELSON-MORGAN, et visualisation en lumière UV.

Chez *Sarcina lutea*, uniquement, une tache s'est révélée positive à chacun de ces réactifs. Il s'agit d'un composé comprenant des nucléotides (UV), des acides aminés (ninhydrine) et des sucres aminés (ELSON MORGAN).

Cette tache correspondant aux nucléotides précurseurs du peptidoglycane n'a pas été retrouvée chez *Spiroplasma citri* ni chez *Acholeplasma laidlawii*.

#### Conclusion.

L'ensemble de ces faits confirme l'appartenance de *Spiroplasma citri* à la classe des Mollicutes. La présence de glucosamine observée dans les extraits «DNase», trouvée également par RAZIN, est un phénomène courant chez les mycoplasmes. La situation externe des hexosamines expliquerait peut-être leur élimination par le traitement RNase-trypsine.

Le DNA de *Spiroplasma citri* renferme 26 moles p. 100 de paires de bases guanine (G) + cytosine (C).

Le pourcentage de G + C dans le DNA de *S. citri* a été déterminé par deux techniques : à partir de la densité de flottation dans le CICs (1,686 g/ml) et à partir de la température de fusion en milieu 1 SSC (81°C). Il est voisin de 26 moles p. 100. Un pourcentage faible de ce type n'est pas inhabituel chez les mycoplasmes.

*S. citri* est une bonne source pour l'obtention de DNA à faible pourcentage de G + C. Le laboratoire du Professeur HORN (Université de Nancy) a étudié sa conformation par diffraction des rayons X à différentes concentrations salines et différentes humidités relatives, en comparaison avec des DNA à pourcentage de G + C plus élevé (42 et 72 p. 100) (ALBISER et al., 1973 ; PREMILAT et ALBISER, 1975). Le DNA à haut pourcentage de G + C se caractérise par l'absence de la forme C en sel de lithium et par l'absence de la forme A en sel de sodium à concentration supérieure à 3,5 p. 100 (p/p). Il existe principalement dans la conformation B.

*Spiroplasma citri* a un génome de  $10^9$  daltons.

Nous avons déterminé la taille du génome de *S. citri* d'après la constante de vitesse de la réaction de renaturation du DNA dénaturé, et le coefficient de sédimentation de ce même DNA dénaturé (WETMUR et DAVIDSON, 1968). Nous avons trouvé une valeur moyenne voisine de  $10^9$  d. Cette valeur est intéressante à considérer. En effet quand, en 1972, ce travail a été réalisé, on savait que seuls les représentants du genre *Acholeplasma* avaient un génome de cette taille :  $10^9$  d., les autres mycoplasmes avaient un génome deux fois plus petit :  $5 \times 10^8$  d. Rappelons que le DNA d'*E. coli* pèse  $2,7 \times 10^9$  d. Depuis un nouveau genre a été découvert, le genre *Thermoplasma*, qui lui-aussi a un DNA de  $10^9$  d. Mais ni les représentants du genre *Acholeplasma* ni ceux du genre *Thermoplasma* n'exigent la présence de cholestérol dans le milieu, alors que *S. citri* le requiert d'une façon absolue.

	Génome (daltons)	G+C (moles p. 100)	Exigence en cholestérol
<i>Acholeplasma</i>	$10 \times 10^8$	33	non
<i>Mycoplasma</i>	$5 \times 10^8$	25 - 40	oui
<i>Spiroplasma</i>	$10 \times 10^8$	26	oui
<i>Ureaplasma</i>	$5 \times 10^8$	28	oui
<i>Thermoplasma</i>	$10 \times 10^8$	46	non
<i>Anaeroplasm</i>		33 - 40	oui + non

Ainsi d'après la taille du génome ( $10^9$  d.) et l'exigence en cholestérol, *S. citri* ne ressemblait à aucun des mycoplasmes connus comme le montre le tableau ci-dessus. Mais, pris séparément, ni la taille du génome ni le besoin en cholestérol ne sont des propriétés particulières de *S. citri*. C'est l'association de ces deux caractères qui différencie *S. citri* des autres mycoplasmes.

*Spiroplasma citri* n'a pas de relation sérologique avec les mycoplasmes animaux.

Une confirmation du caractère nouveau de *S. citri* se trouve dans le fait que l'organisme n'a pas de relations sérologiques avec aucun des mycoplasmes animaux connus. Ce fait était important au début des recherches sur l'organisme isolé des agrumes, car il indiquait que le mycoplasme isolé ne pouvait être le résultat d'une contamination par un mycoplasme connu de l'homme ou de l'animal. Pour ces études sérologiques il convenait de disposer des immunosérum spécifiques de tous les mycoplasmes connus. C'est pourquoi ce travail a été réalisé en collaboration avec trois laboratoires étrangers : celui du Professeur FREUNDT de l'Université d'Aarhus au Danemark, celui du Dr TAYLOR-ROBINSON, M.R.C. Clinical Research Center - Harrow - Angleterre, et celui du Dr TULLY, N.I.H., Bethesda - Etats Unis.

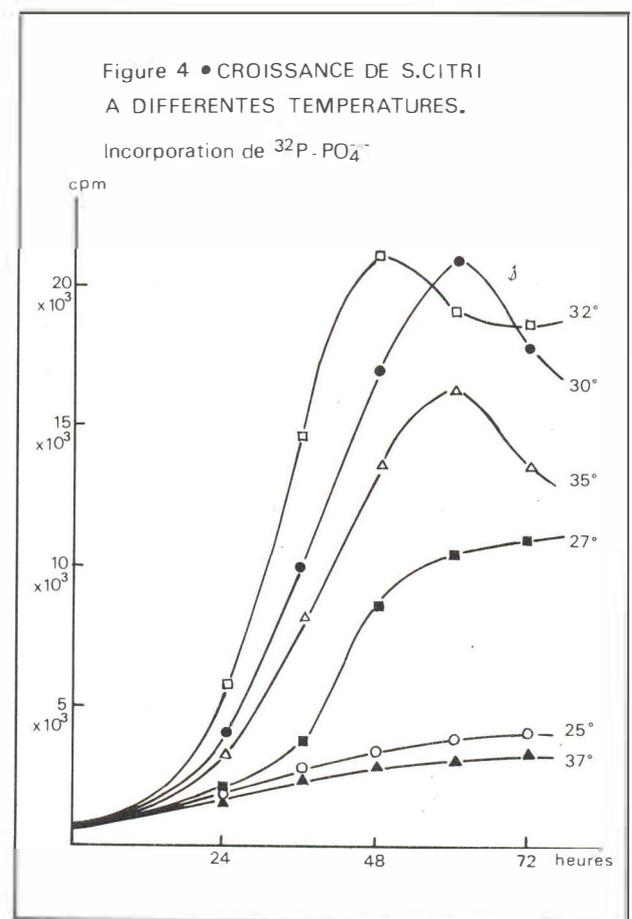
Propriétés particulières de *Spiroplasma citri*.

Température de croissance optimum :  $32^\circ\text{C}$ .

La température à laquelle la croissance est la plus rapide avec un temps de génération de six heures, est égale à  $31-32^\circ\text{C}$ . L'optimum de température est étroit : à  $25^\circ\text{C}$  et à  $37^\circ\text{C}$  il n'y a guère de croissance (figure 4).

Le fait que *S. citri* ait une température optimum de  $32^\circ\text{C}$  n'est pas le résultat de la sélection d'une souche particulière par la culture des plants à la température de  $32^\circ\text{C}$  ( $32^\circ\text{C}$  pendant seize heures de jour et  $27^\circ\text{C}$  pendant huit heures de nuit). L'organisme isolé d'agrumes de plein champ ou cultivés en serre à des températures situées entre  $27^\circ\text{C}$  et  $37^\circ\text{C}$ , ou de plants de pervenches (voir plus loin : hôtes de *S. citri*) cultivés aux environs de  $25^\circ\text{C}$ , présente aussi une température de croissance optimum de  $31^\circ\text{C}-32^\circ\text{C}$ . Enfin une préparation de *S. citri* cultivé pendant plusieurs passages à une température différente de  $32^\circ\text{C}$ , continue de présenter par la suite une température optimum de  $32^\circ\text{C}$ .

*S. citri* est le seul mycoplasme possédant un optimum de température étroit à  $32^\circ\text{C}$ . Les agrumes se développent en général dans les régions subtropicales où des températures diurnes de  $32^\circ\text{C}$ , voire supérieures à  $32^\circ\text{C}$  ne sont pas rares ;



elles favorisent dès lors la croissance de l'organisme pathogène et, partant, elles accentuent la sévérité des symptômes. En Corse où les températures ne dépassent que rarement 30°C les symptômes du stubborn ne sont que peu exprimés.

*Spiroplasma citri* est un mycoplasme spiralé.

*Spiroplasma citri*, bénéficie de la propriété d'avoir été le premier mycoplasme cultivé, qui ait manifesté une morphologie déterminée : une morphologie spiralée. Cette morphologie s'observe tant *in situ* dans les tubes criblés de la plante (planche 4) qu'en culture *in vitro* (planche 4).

La morphologie spiralée est extrêmement commode pour repérer et caractériser rapidement l'organisme. Elle a été l'un des arguments déterminant pour affirmer l'identité entre l'organisme cultivé à partir des agrumes malades et l'organisme observé *in situ* dans les mêmes plantes ; elle rendait très peu probable l'hypothèse que l'organisme cultivé était le résultat d'une contamination accidentelle.

Nous verrons plus loin que depuis la découverte de *S. citri*, d'autres mycoplasmes végétaux ont été mis en évidence et cultivés. La seule morphologie spiralée n'est donc pas suffisante pour déterminer la nature exacte d'un spiroplasma donné.

*Spiroplasma citri* est un mycoplasme motile en milieu liquide.

La morphologie spiralée de *S. citri* est très probablement reliée à une autre propriété unique de cet organisme : sa motilité en milieu liquide en l'absence de tout support solide. WORLEY et DAVIS ont réalisé un film dans lequel on voit *S. citri* se mouvoir dans la gélose semi-liquide. Le mouvement est rotatoire comme un «tire-bouchon» qui pénètre dans le liège. Le mouvement rotatoire s'inverse parfois et dès lors la progression s'arrête. Les spirales peuvent aussi se plier et donner un mouvement d'ondulation ; celui-ci ne provoque pas le déplacement de l'organisme (COLE et al., 1973).

Parmi les mycoplasmes animaux *Mycoplasma pneumoniae*, *M. gallisepticum* et *M. pulmonis* témoignent d'une certaine motilité de glissement, mais pour cela un support solide est nécessaire (BREDET, 1974).

*Spiroplasma citri* peut héberger un, deux ou trois virus.

La découverte en 1972 de virus chez *S. citri* (COLE et al., 1973) n'était pas un fait nouveau chez les mycoplasmes : chez *Acholeplasma* deux types de virus avaient été décrits, l'un en forme de bâtonnet (MV-L1), l'autre très voisin d'un bactériophage de type T 3 (MV-L3) (GOURLAY, 1974; MANILOFF et al., 1977).

Ce qui était particulier à *S. citri* avait trait à la nature du virus observé : il s'agissait d'un virus (SV-C2) de même morphologie que les bactériophages de type B, à longue queue non contractile (planche 5). Ensuite deux autres virus ont été observés chez *S. citri* (COLE et al., 1974). L'un,

en bâtonnet (SV-C1) ressemblait à MV-L1 d'*Acholeplasma* et l'autre, en forme de petit bactériophage (SV-C3) était similaire à MV-L3 d'*Acholeplasma*. Certains isolements de *S. citri* hébergent un, d'autres deux, d'autres encore trois virus à la fois.

*Spiroplasma citri* est l'agent causal de la maladie du stubborn des agrumes.

Les propriétés précédentes montrent : 1) que *S. citri* est bien un mycoplasme et 2) qu'il s'agit d'un mycoplasme d'un type nouveau. En outre elles établissent solidement les deux premières conditions exigées pour démontrer qu'un organisme donné est l'agent causal d'une maladie : 1) présence de l'organisme soupçonné dans les individus malades, les agrumes atteints de «stubborn» en l'occurrence, et son absence chez les individus sains, et 2) l'obtention de l'agent en culture pure à partir des individus malades. Les deux autres conditions requises, à savoir : 1) reproduction expérimentale de la maladie par inoculation de l'agent cultivé à des individus sains, et 2) réisolement de l'agent à partir des individus inoculés expérimentalement et ayant manifesté les symptômes typiques de la maladie; ces deux conditions ont été remplies à la suite des travaux de MARKHAM et al. (1974) en Angleterre. Ces auteurs ont injecté une culture pure de *S. citri* dans des cicadelles de l'espèce *Euscelis plebejus*, connue pour son aptitude à transmettre certaines «jaunisses» des plantes. Les cicadelles injectées ont été placées sur des plants d'orangers sains. Ceux-ci ont manifesté peu après les symptômes typiques de la maladie du «stubborn». Enfin *S. citri* a pu être réisolé des plantes inoculées expérimentalement.

*Spiroplasma citri* se multiplie et se comporte comme un agent pathogène dans des plantes autres que les agrumes.

Par l'intermédiaire des cicadelles, *S. citri* a pu être transmis à des plantes autres que les agrumes, dans lesquelles il a provoqué une maladie aussi grave, sinon plus, que chez les agrumes : pois, trèfle, fève, pervenche (MARKHAM et TOWNSEND, 1974 ; MARKHAM et al., 1974).

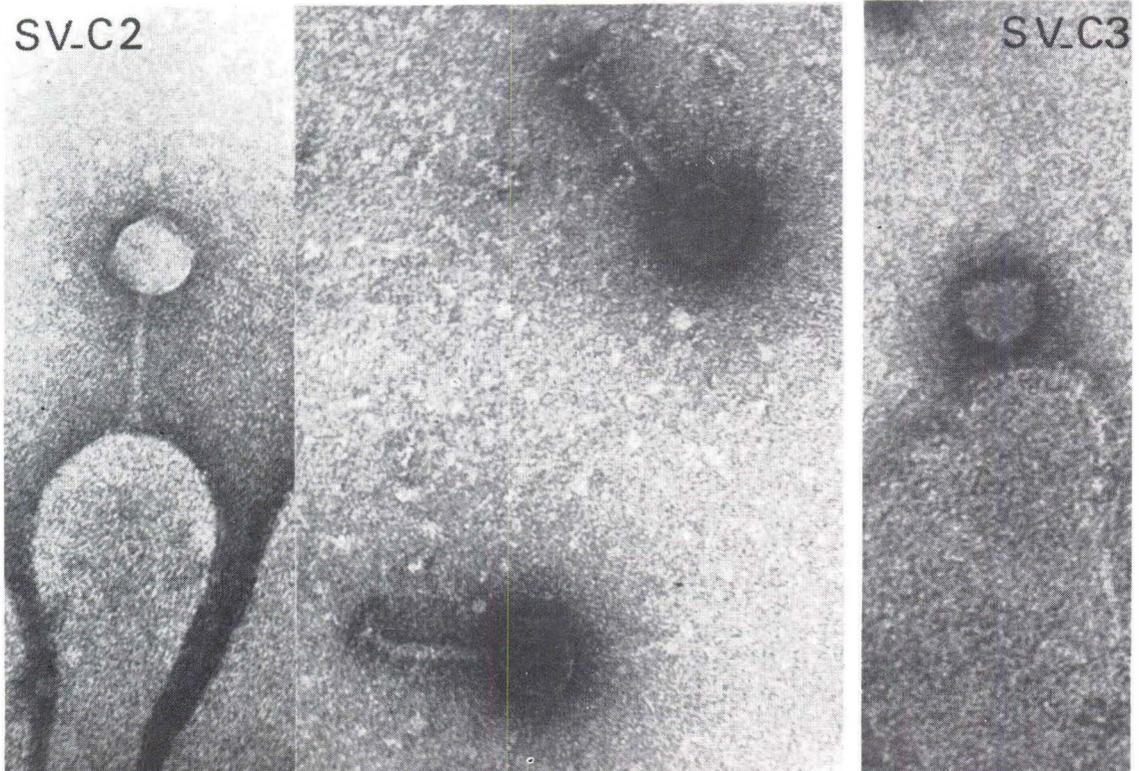
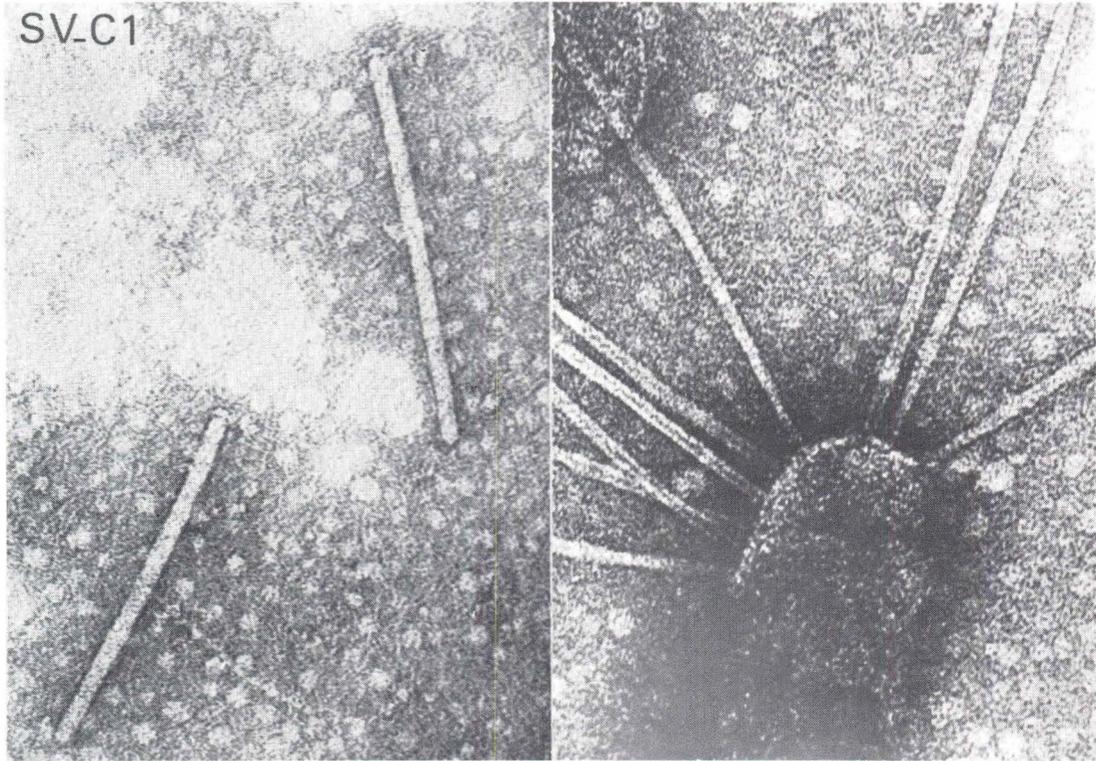
Par ailleurs *S. citri* a été isolé de pervenches malades, trouvées en Arizona (ALLEN, 1975), en Californie (GRANETT et al., 1976) et au Maroc (BOVÉ et al., 1978 et 1979 b). Il semble aussi que l'organisme soit responsable de la forme «monstrosa» d'*Opuntia tuna* (KONDO et al., 1976 a et b). En Californie de nombreuses plantes appartenant à plus de quinze familles différentes ont été infectées par *S. citri*, soit expérimentalement au moyen de cicadelles soit dans les conditions naturelles (CALAVAN et al., 1976 ; OLDFIELD et al., 1977).

Ces faits indiquent l'existence de plantes «réservoir» à *S. citri*.

La possibilité de cultiver *Spiroplasma citri*, a permis de caractériser l'insecte vecteur du «stubborn» des agrumes en Californie.

En Californie, CALAVAN et ses collaborateurs ont

Planche 5 - VIRUS DE *SPIROPLASMA CITRI*.  
(Vues au microscope électronique dues à R.M. COLE, N.I.H., BETHESDA, USA).



récolté en verger d'agrumes atteints de stubborn, toute une série d'insectes vecteurs possibles. Ils les ont utilisés pour préparer des homogénats au moyen desquels ils ont inoculé des milieux de culture propices au développement de *S. citri*. Ils ont ainsi déterminé que les cicadelles des espèces *Scaphytopius nitridus* et *Circulifer tenellus* hébergeaient *S. citri* (LEE et al., 1973). Ils ont ensuite démontré que ces espèces étaient capables 1) de s'infecter sur agrumes atteints de stubborn et 2) de retransmettre *S. citri* à la pervenche et aux agrumes (KALOOSTIAN et al., 1975 ; OLDFIELD et al., 1976). Une troisième espèce *Scaphytopius acutus* DELONGI transmet *S. citri* en Californie (KALOOSTIAN et al., 1979).

### LES SPIROPLASMES, UN NOUVEAU GROUPE D'AGENTS PATHOGENES DES VEGETAUX ET DES ANIMAUX

#### Les spiroplasmes chez les végétaux.

*Spiroplasma citri*, l'agent du stubborn des agrumes, a été le premier mycoplasme végétal qui ait été cultivé et caractérisé et dont la pathologie ait été prouvée. Ces travaux ont montré qu'il pouvait exister des mycoplasmes à morphologie spiralée. Cependant *S. citri* n'est pas le seul mycoplasme végétal de forme spiralée : chez le maïs, l'organisme responsable du nanisme («corn stunt»), est aussi spiralé (DAVIS et WORLEY, 1973). Il convient de remarquer d'ailleurs que la morphologie spiralée de l'organisme du maïs a été observée avant celle de *S. citri*, mais le fait que l'organisme du maïs n'avait pas été obtenu en culture à cette époque rendait impossible la caractérisation même de cet organisme. Cette étude ne pouvait se faire qu'avec un organisme cultivé et c'est pourquoi *S. citri* est devenu l'organisme type des spiroplasmes. Le spiroplasma du maïs n'a été obtenu en culture qu'en 1975, quatre ans après *S. citri* (CHEN et LIAO, 1975 ; WILLIAMSON et WHITCOMB, 1975).

Nous avons montré que l'organisme du maïs est relié sérologiquement à *S. citri* (TULLY et al., 1974 ; GARCIA-JURADO et al., 1978) et que le DNA des deux organismes s'hybride à 50 p. 100 (DAVIS et al., 1974). Après *S. citri* et le spiroplasma du Corn stunt, d'autres spiroplasmes ont été décrits. CHEN et al. (1977) ont isolé du chiendent (*Cynodon dactylon*), un spiroplasma sérologiquement différent de *S. citri* ; malheureusement cet isolement a été perdu. BOVÉ et al. (1979 b) ont recherché par le test ELISA (SAILLARD et al., 1978) la présence de *S. citri* dans des fragments de chiendent atteints d'albinisme provenant de vergers d'agrumes du Souss et du Tadla au Maroc ; le test était positif. Avec d'autres fragments de chiendent atteints d'albinisme et venant du Gharb, le test était négatif. Il n'est donc pas exclu que certaines pousses de chiendent malade puisse héberger *S. citri*. Enfin DAVIS et al. (1977) et DAVIS (1978) ont découvert des spiroplasmes à la surface des nectaires de certaines fleurs comme celles du tulipier (*Liriodendron tulipifera*). Il n'est pas exclu que ces spiroplasmes puissent y être déposés par les abeilles qui, comme on le verra plus loin, peuvent être infectées par des spiro-

plasmes.

Les spiroplasmes chez les insectes : cicadelles, drosophiles et abeilles.

Nous avons vu plus haut que certaines cicadelles hébergent *S. citri* et ont l'aptitude à le transmettre soit expérimentalement soit dans la nature. D'autres cicadelles assurent la multiplication de l'organisme sans pour autant être capables de le transmettre. Nous avons montré en collaboration avec WHITCOMB que *S. citri* se multipliait dans la cicadelle vectrice du «Corn stunt», *Dalbulus eliminatus*, et dans celle de la jaunisse de la reine-marguerite, *Macrostelus fascifrons*, dont il diminue la longévité (WHITCOMB et al., 1973). Enfin *S. citri* est retenu plus ou moins longtemps par certains insectes sans qu'on sache s'il s'y multiplie.

Sur plus de trente espèces de cicadelles rencontrées au Maroc (MOUTOUS et al., 1979) et examinées par le test immunoenzymatique ELISA (SAILLARD et al., 1978) pour la présence de *S. citri*, sept ont réagi positivement : *Euscelis alsius* (RIBAUT), *Exitianus capicola* (STAL.), *Laelaphax striatella* (FALLEN), *Neoliturus haematoceps* (MULSANT et REY), *Psammotettix striatus* (LINNAEUS), *Recilia angustisectus* (LINNAVUORI) et *Toya propinqua* (FIEBER) ; *S. citri* a pu être isolé et cultivé à partir de *Neoliturus haematoceps* (BOVÉ et al., 1979 a).

Un cas de spiroplasma très intéressant est celui que l'on rencontre chez certaines drosophiles tropicales. En 1961 POULSON et SAKAGUCHI (1961) mettent en évidence dans la drosophile un organisme spiralé dont l'effet pathogène se traduit par une élimination des mâles dans la descendance. Sur la base de la morphologie spiralée, ils concluent que l'organisme est une spirochète du type *Treponema*. La découverte de *S. citri* a poussé ces auteurs et d'autres à reprendre ces études et à démontrer que l'organisme impliqué est non pas une spirochète mais bien un spiroplasma, non encore cultivé à l'heure actuelle (WILLIAMSON et WHITCOMB, 1974).

Enfin très récemment CLARK (1977) a découvert que les abeilles pouvaient être fortement infectées par des spiroplasmes qu'il a réussi à isoler et cultiver et qui sont pathogènes pour l'abeille.

#### Les spiroplasmes chez les vertébrés.

Les spiroplasmes viennent enfin d'être mis en évidence chez les vertébrés (TULLY et al., 1976). Il s'agit de l'agent qui, transmis par tique, provoque expérimentalement chez le souriceau une cataracte et une infection chronique du cerveau ; cet agent était supposé être un virus lent ; c'est en réalité un spiroplasma qui se développe bien dans l'oeuf embryonné et dont la culture vient juste d'être réussie (TULLY et al., 1977). Cet exemple est intéressant car il illustre en pathologie animale une situation tout à fait parallèle à celle que l'on a connue en pathologie végétale où, pendant longtemps, jusqu'en 1967, les maladies à mycoplasmes étaient prises pour des maladies à virus.

Cette rapide revue montre que les spiroplasmes qui, au moment de leur découverte, semblaient n'être que des agents pathogènes limités aux seuls végétaux et insectes, se rencontrent maintenant aussi chez les vertébrés où ils provoquent des effets pathogènes importants. Il n'est pas exclu d'ailleurs que l'homme héberge lui-aussi des spiroplas-

mes pathogènes. Ainsi, l'intérêt des spiroplasmes est en train de dépasser largement le cadre de la pathologie végétale : ces organismes ne peuvent plus être ignorés en pathologie animale, voire humaine. Sur le plan de la biologie fondamentale ils posent des problèmes tout aussi intéressants mais ce n'est pas le lieu, ici, de les aborder.

## BIBLIOGRAPHIE

- ALBISER (G.), HORN (P.), SAGLIO (P.) and BOVÉ (J.M.). 1973.  
*C.R. Hebd. Séances Acad. Sci.*, 276, 653-656.
- ALLEN (R.M.). 1975.  
*Citrograph*, 60, 428.
- BEBEAR (C.), LATRILLE (J.), FLECK (J.), ROY (B.) and BOVÉ (J.M.). 1974.  
*Colloq. Inst. Natl. Santé Rech. Med.*, 33, 35-42.
- BOVÉ (J.M.). 1975.  
*La Recherche*, 6, 210-220.
- BOVÉ (J.M.). 1978.  
Traitement de la maladie du greening des agrumes.  
*Brevet N° 7807855*.
- BOVÉ (J.M.) and SAGLIO (P.). 1974.  
in : *Proc. Sixth Conf. Intern. Organ. Citrus Virologists*.  
(L.G. Weathers and M. Cohen, eds), p. 1-11, Univ. of California Press, Berkeley.
- BOVÉ (J.M.) and SAILLARD (C.). 1979.  
Cell Biology of Spiroplasma.  
in. *The Mycoplasmas*, vol. III, p. 83-152, Academic Press.
- BOVÉ (J.M.), SAGLIO (P.), TULLY (J.G.), FREUNDT (E.A.), LUND (Z.), PILLOT (J.) and TAYLOR-ROBINSON (D.). 1973.  
*Ann. N.Y. Acad. Sci.*, 225, 462-470.
- BOVÉ (J.M.), CALAVAN (E.C.), CAPOOR (S.P.), CORTEZ (B.E.) and SCHWARTZ (R.E.). 1974.  
in. *Proc. Sixth Conf. Intern. Organ. Citrus Virologists*.  
(L.G. Weathers and M. Cohen, eds) p. 12-15. Univ. of California Press, Berkeley.
- BOVÉ (J.M.), VIGNAULT (J.C.), GARNIER (M.), SAILLARD (C.), GARCIA-JURADO (O.), BOVE (C.) and NHAMI (A.). 1978.  
*C.R. Hebd. Séances Acad. Sci. Ser. D*, 286, 57-59.
- BOVÉ (J.M.), MOUTOUS (G.), SAILLARD (C.), FOS (A.), BONFILS (J.), VIGNAULT (J.G.), NHAMI (A.), ABASSI (M.), KABBAGE (K.), HAFIDI (B.), MOUCHES (G.) and VIENNOT-BOURGIN (G.). 1979 a  
*C.R. Hebd. Séances Acad. Sci. Ser. D*, 288, 335-338.
- BOVÉ (J.M.), NHAMI (A.), SAILLARD (C.), VIGNAULT (J.G.), MOUCHES (C.), GARNIER (M.), MOUTOUS (G.), FOS (A.), BONFILS (J.), ABASSI (M.), KABBAGE (K.), HAFIDI (B.) and VIENNOT-BOURGIN (G.). 1979 b  
*C.R. Hebd. Séances Acad. Sci. Ser. D*, 288, 399-402.
- BREDDT (W.). 1974.  
*Colloq. Inst. Natl. Santé Rech. Med.*, 33, 47-52.
- CALAVAN (E.C.), KALOOSTIAN (G.H.) and OLDFIELD (G.N.). 1976.  
*Citrograph*, 61, 289-390.
- CHANOCK (R.M.), HAYFLICK (L.) and BARILE (M.F.). 1962.  
*Proc. Nat. Acad. Sci.*, 48, 41-49.
- CHARGAFF (E.), SCHULMAN (H.M.), and SHAPIRO (H.S.). 1957.  
*Nature*, 180, 851-852.
- CHEN (T.A.) and LIAO (C.H.). 1957.  
*Science*, 188, 1015-1017.
- CHEN (T.A.), SU (H.J.), RAJU (B.C.) and HUANG (W.C.). 1977.  
*Proc. Am. Phytopathol. So.*, 4, 171 (abstr.).
- CLARK (H.F.). 1977.  
*J. Invertebr. Pathol.*, 29, 112-113.
- COLE (R.M.), TULLY (J.G.), POPKIN (T.J.) and BOVE (J.M.). 1973.  
*J. Bacteriol.*, 115, 367-386.
- COLE (R.M.), TULLY (J.G.) and POPKIN (T.J.). 1974.  
*Colloq. Inst. Natl. Santé Rech. Med.*, 33, 125-132.
- DAVIS (R.E.). 1978.  
*Zentralblatt Bakt. Paras. Infekt. Krank. Hygiene. Reihe A*, 241 192 (abstr.).
- DAVIS (R.E.) and WORLEY (J.F.). 1973.  
*Phytopathology*, 63, 403-408.
- DAVIS (R.E.), DUPONT (G.), SAGLIO (P.), ROY (B.), VIGNAULT (J.C.) and BOVÉ (J.M.). 1974.  
*Colloq. Inst. Natl. Santé Rech. Med.*, 33, 187-194.
- DAVIS (R.E.), WORLEY (J.F.) and BASCIANO (L.K.). 1977.  
*Proc. Am. Phytopathol. Soc.*, 4, 185 (abstr.).
- DIENES (L.) and EDSALL (G.). 1937.  
*Proc. Soc. Exper. Biol. Med.*, 36, 740.
- DOI (Y.), TERANAKA (M.), YORA (K.), and ASUYANA (H.). 1967.  
*Ann. Phytopathol. Soc., Jpn.*, 33, 259-266.
- FLECK (J.) and MOCK (M.). 1971.  
*C.R. Acad. Sc. Paris*, 272, Ser. D, 1560-1562.
- FREEMAN (B.A.), SISENSTEIN (R.), McMANUS (T.T.), WOODWARD (J.E.), LEE (I.M.) and MUDD (J.B.). 1976.  
*J. Bacteriol.*, 125, 946-954.
- FUDL-ALLAH (A.E.S.A.), CALAVAN (E.C.) and IGWEGBE (E.C.K.). 1972.  
*Phytopathology*, 62, 729-731.
- GARCIA-JURADO (O.), SAILLARD (C.), DUNEZ (J.) and BOVÉ (J.M.). 1978.  
*Zentralblatt Bakt. Paras. Infekt. Krank. Hygiene. Reihe A*, 241, 229-230 (abstr.).
- GARNIER (M.) and BOVÉ (J.M.). 1977.  
*Fruits*, 32, 749-752.
- GARNIER (M.) and BOVÉ (J.M.). 1978.  
*Zentralblatt Bakt. Paras. Infekt. Krank. Hygiene. Reihe A*, 241, 221-222.
- GHUYSEN (J.M.), TIPPER (D.J.) and STROMINGER (J.L.). 1966.  
*Methods in Enzymology, Acad. Press New-York, London*, VIII, 118, 685-693.
- GOURLAY (R.N.). 1974.  
*C.R.C. Crit. Rev. Microbiol.*, 3, 315-331.
- GRANETT (A.L.), BLUE (R.L.), HARJUNG (M.K.), CALAVAN (E.C.) and GUMPF (D.J.). 1976.  
*Calif. Agric.*, 30, 18-19.
- IGWEGBE (E.C.K.) and CALAVAN (E.C.). 1970.  
*Phytopathology*, 60, 1525-1526.
- ISHIE (T.), DOI (Y.), YORA (K.) and ASUYAMA (H.). 1967.  
*Ann. Phytopathol. Soc., Japan* 33, 267-275.
- KALOOSTIAN (G.H.), OLDFIELD (G.N.), PIERCE (H.D.), CALAVAN (E.C.), GRANETT (A.L.), RANA (G.L.), and GUMPF (D.J.). 1975.  
*Calif. Agric.*, 29, 14-15.
- KALOOSTIAN (G.H.), OLDFIELD (G.N.), PIERCE (H.D.), and CALAVAN (E.C.). 1979.

- in «*Leathopper Vectors and Plant Disease Agents*» (K. Maramorosch and K.S. Harris, eds.) p. 447-450, Academic Press, New-York.
- KONDO (F.), McINTOSH (A.H.), PADHI (S.B.) and MARAMOROSCH (K.). 1976 a .  
*Proc. Soc. Gen. Microbiol.*, 3, part 4, 154.
- KONDO (F.), McINTOSH (A.H.), PADHI (S.B.), and MARAMOROSCH (K.). 1976 b.  
*Proc. Electrom Microsc. Soc. Am.*, 34, 56-57.
- LAFLÈCHE (D.) and BOVÉ (J.M.). 1970 a.  
*C.R. Acad. Sci. Paris, Ser. D*, 270, 1915-1917.
- LAFLÈCHE (D.) and BOVÉ (J.M.). 1970 b.  
*Fruits*, 25, 455-465.
- LATRILLE (J.), FLECK (J.), VIGNAULT (J.C.), SAGLIO (P.) and BOVÉ (J.M.). 1973.  
*1st Int. Congress for Bacteriol., Jerusalem*, september 2-7 1973, Abstr. vol. II Free papers p. 104.
- LEE (I.M.), CARTIA (G.), CALAVAN (E.C.) and KALOOSTIAN (G.H.). 1973.  
*Calif. Agric.*, 27 (II), 14-15.
- MANILOFF (J.), DAS (J.) and CHRISTENSEN (J.R.). 1977.  
*Adv. Virus Res.*, 21, 343-380.
- MARKHAM (P.G.) and TOWNSEND (R.). 1974.  
*Colloq. Inst. Natl. Sante Rech. Med.*, 33, 201-206.
- MARKHAM (P.G.), TOWNSEND (R.), BAR-JOSEPH (M.), DANIELS (M.J.), PLASKITT (A.) and MEDDINS (B.M.). 1974.  
*Ann. Appl. Biol.*, 78, 49-57.
- MOUTOUS (G.), FOS (A.), BONFILS (J.), NHAMI (A.), ABASSI (M.), KABBAGE (K.), SAILLARD (C.), VIGNAULT (J.C.), HAFIDI (B.), MOUCHES (C.), VIENNOT-BOURGIN (G.) and BOVÉ (J.M.). 1979.  
*Fruits*, (sous presse).
- NOCARD (E.) and ROUX (E.R.). 1898 .  
*Ann. Inst. Pasteur*, 1898, 12, 240-262.
- OLDFIELD (G.N.), KALOOSTIAN (G.H.), PIERCE (H.D.), CALAVAN (E.C.), GRANETT (A.L.) and BLUE (R.L.). 1976.  
*Calif. Agric.*, 30 (6), 35.
- OLDFIELD (G.N.), KALOOSTIAN (G.H.), PIERCE (H.D.), SULLIVAN (D.A.), CALAVAN (E.C.) and BLUE (R.L.). 1977.  
*Citrograph*, 62, 309-312.
- POULSON (D.F.) and SAKAGUCHI (B.). 1961.  
*Science*, 133, 1489-1490.
- PREMILAT (S.) and ALBISER (G.). 1975.  
*J. Mol. Biol.*, 99, 27-36.
- RAZIN (S.), HASIN (M.), NEEMAN (Z.) and ROTTEM (S.). 1973.  
*J. Bacteriol.*, 116, 1421-1435.
- SAGLIO (P.), LAFLÈCHE (D.), BONISSOL (C.) and BOVÉ (J.M.). 1971 a .  
*C.R. Hebd. Séances Acad. Sci. Ser. D*, 272, 1387-1390.
- SAGLIO (P.), LAFLÈCHE (D.), BONISSOL (C.) and BOVÉ (J.M.). 1971 b.  
*Physiol. Veg.*, 9, 569-582.
- SAGLIO (P.), L'HOSPITAL (M.), LAFLÈCHE (D.), DUPONT (G.), BOVÉ (J.M.), TULLY (J.G.) and FREUNDT (E.A.). 1973.  
*Int. J. Syst. Bacteriol.*, 23, 191-204.
- SAILLARD (C.), DUNEZ (J.), GARCIA-JURADO (O.), NHAMI (A.), et BOVÉ (J.M.). 1978.  
*C.R. Hebd. Séances Acad. Sci. Ser D*, 286, 1245-1248.
- STROMINGER (J.L.). 1957.  
*J. Biol. Chem.*, 224, 509-523.
- TULLY (J.G.), WHITCOMB (R.F.), BOVÉ (J.M.) and SAGLIO (P.). 1973.  
*Science*, 182, 827-829.
- TULLY (J.G.), WHITCOMB (R.F.), WILLIAMSON (D.L.) and CLARK (H.F.). 1976.  
*Nature (London)*, 259, 117-120.
- TULLY (J.G.), WHITCOMB (R.F.), CLARK (H.F.) and WILLIAMSON (D.L.). 1977.  
*Science*, 195, 892-894.
- WETMUR (J.G.) and DAVIDSON (N.). 1968.  
*J. Mol. Biol.*, 31, 349-370.
- WHITCOMB (R.F.), TULLY (J.G.), BOVÉ (J.M.) and SAGLIO (P.). 1973.  
*Science*, 182, 1251-1253.
- WILLIAMSON (D.L.) and WHITCOMB (R.F.). 1974.  
*Colloq. Inst. Natl. Sante Rech. Med.*, 33, 283-290.
- WILLIAMSON (D.L.) and WHITCOMB (R.F.). 1975.  
*Science*, 188, 1018-1020.

