Mise au point par l'épreuve d'infectivité d'un milieu
d'extraction et d'un milieu de survie, d'une méthode de
purification et de conservation au froid de l'agent
pathogène (MLO) de la flavescence dorée

Antoine Caudwell, Catherine Kuszala

► To cite this version:

Antoine Caudwell, Catherine Kuszala. Mise au point par l'épreuve d'infectivité d'un milieu d'extraction et d'un milieu de survie, d'une méthode de purification et de conservation au froid de l'agent pathogène (MLO) de la flavescence dorée. *Agronomie*, 1986, 6 (10), pp.885-892. hal-00884835

HAL Id: hal-00884835

<https://hal.science/hal-00884835>

Submitted on 1 Jan 1986

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

Mise au point par l'épreuve d'infectivité d'un milieu d'extraction et d'un milieu de survie, d'une méthode de purification et de conservation au froid de l'agent pathogène (MLO) de la flavescence dorée

Antoine CAUDWELL & Catherine KUSZALA

I.N.R.A., Station de Recherches sur les Mycoplasmes et les Arbovirus des Plantes, Centre de Recherches de Dijon, B.V. 1540, F 21034 Dijon

RÉSUMÉ

Les MLO sont sensibles au milieu liquide dans lequel ils sont purifiés. Nous présentons ici les milieux retenus par notre laboratoire après 10 ans de recherches. Le milieu 1379, riche en sérum et en complexes biologiques doit être utilisé pour les survies et pour les opérations longues. Le milieu 1464, qui est dépourvu de composés complexes permet une bonne extraction des MLO ; il est utilisé pour la préparation des sérums.

Ces milieux ont permis d'améliorer l'extraction des MLO. Il est ainsi devenu possible de diluer les extraits au 1/100 pour l'épreuve d'infectivité et de comparer de nombreuses dilutions, comme en bactériologie.

Les extraits liquides de MLO peuvent être congelés à -80°C dans le milieu 1379, et conservés plusieurs mois, sans perte d'infectivité.

Une méthode de purification des MLO est proposée qui comporte deux clarifications successives, une double préfiltration, une filtration et une sédimentation.

Mots clés additionnels : *Mycoplasmes, vigne, cicadelle, insecte vecteur.*

SUMMARY

Definition by the infectivity test of a medium for extraction and survival, and of a method for purification and cryopreservation in vitro of the grapevine flavescence dorée pathogen (MLO).

MLOs are sensitive to the liquid medium used for their purification. We present here two media defined by our work of the last 10 years. Medium 1379, containing serum and biological complexes could be used for prolonged operations, including survival. Medium 1464 which contains no complex component allowed good MLO extraction and the preparation of sera. The progress made with these media introduces the possibility of diluting extracts to 1/100 before infectivity tests and of making comparisons between numerous dilutions, as in bacteriology. Medium 1379 allowed deep-freezing of the MLO in liquid extracts at -80°C which could be stored for months without any loss of infectivity. A method of MLO purification is proposed which includes two successive clarifications, double prefiltration, filtration and sedimentation.

Additional key words : *Mycoplasma, grapevine, leafhopper, vector insect.*

I. INTRODUCTION

Les agents pathogènes des jaunisses des plantes, étudiés depuis le début du siècle, restent les plus mal connus de la pathologie végétale. Considérés d'abord comme des virus, ils ont été reconnus *in situ* en 1967 (DOI *et al.*, 1967) comme étant des procaryotes sans paroi, ressemblant à des mycoplasmes et appelés MLO (Mycoplasma-like-organisms) pour cette raison.

Cette observation n'apportait pas la preuve du rôle de ces procaryotes dans l'étiologie des jaunisses. Il était nécessaire, selon les postulats de Koch, de les purifier et de les caractériser en milieu liquide. Or, aucun laboratoire n'y est parvenu à ce jour, hormis l'obtention récente de leur image en immunosorbant électromicroscopie (CAUDWELL *et al.*, 1982). Les purifications de SINHA et collaborateurs (SINHA, 1974 ; SINHA & BENHAMOU, 1983) qui s'inscrivent dans une

démarche similaire conservent très mal l'infectivité et demanderaient à être confirmées par d'autres éléments.

Cette difficulté dans la caractérisation des MLO est liée à un problème de concentration. On peut en effet calculer (Fig. 1) qu'au grossissement $10\,000\times$ qui est nécessaire pour les reconnaître, il en faudrait une concentration de $1,8 \times 10^9$ pour en voir, en moyenne, un par champ du microscope électronique (CAUDWELL, 1978). Le bactériologiste parvient à ce niveau de concentration par la multiplication en milieu liquide, le virologue y parvient par la purification et la concentration. Or, les MLO ne sont pas cultivables *in vitro* et à l'opposé des virus, ils sont hétérogènes de taille, de forme et de densité, et ne peuvent être obtenus purifiés.

Le choix de notre laboratoire a été d'augmenter la concentration des MLO dans les extraits, en améliorant les milieux et les méthodes d'extraction. En l'absence de toute possibilité de reconnaissance visuelle, sérologique ou autre, cette approche a été guidée par la seule épreuve d'infectivité, c'est-à-dire par la détection des MLO infectieux.

Le second choix du laboratoire a été de mener de front l'amélioration de l'extraction des MLO à partir de l'insecte vecteur et à partir des plantes hôtes. Nous avons toujours maintenu cette exigence, afin de parvenir à croiser les sérums antivecteurs infectieux avec les extraits de plantes malades (ou la réciproque) et à éliminer ainsi, dans les épreuves sérologiques, l'essentiel des réactions non spécifiques. Ce but a été récemment atteint (CAUDWELL *et al.*, 1982 ; BOUDON-PADIEU *et al.*, 1986).

Nous exposerons ici les recherches concernant le choix des milieux d'extraction et de survie à partir des broyats de l'insecte vecteur. L'amélioration des milieux et de la survie a permis de développer de nouvelles méthodes de comparaison que nous décrirons. Nous exposerons aussi les méthodes de congélation des MLO en milieu liquide et les méthodes retenues pour leur purification partielle.

II. MATÉRIEL ET MÉTHODES

A. Le modèle utilisé

Nous avons utilisé comme matériel d'étude une jaunisse qui est d'une grande importance économique, la flavescence dorée de la vigne. Les étapes qui ont permis d'adapter ce modèle au travail de laboratoire ont été la transmission à la fève *Vicia faba* L. (CAUDWELL *et al.*, 1970a) puis l'utilisation d'une cicadelle indigène, *Euscelidus variegatus* KBM, pour la transmission de la fève à la fève (CAUDWELL *et al.*, 1970b) et la mise au point d'une épreuve d'infectivité sensible et fidèle (CAUDWELL, 1977).

B. La production de cicadelles saines et infectieuses

L'élevage de *E. variegatus* a été systématisé (CAUDWELL & LARRUE, 1977) de façon à disposer à tout moment :

— de jeunes cicadelles adultes saines, propres à être injectées,

Figure 1

Relation entre le grossissement et la concentration donnant une particule par champ du microscope.

Calcul de la droite.

Soit C la concentration en particules : $C = \frac{x \text{ particules}}{1 \text{ ml}}$.

Le ml s'étale sur la grille du microscope sur une surface K qui est constante.

$$C = \frac{x}{K} \quad (1)$$

On calcule la concentration donnant en moyenne une particule par champ du microscope : soit S la surface de ce champ.

$$C = \frac{1}{S}; \quad \frac{x}{K} = \frac{1}{S} \quad \text{ou} \quad x = \frac{K}{S} \quad (2)$$

Cette relation devient linéaire en passant en logarithmes :

$$\log x = \log K - \log S$$

C'est la droite de la figure 1.

La relation est linéaire entre le log. de la surface du champ (Log du grossissement) et le log de la concentration donnant une particule par champ (CAUDWELL, 1978).

Relation between magnification and concentration giving one particle per field.

Calculation of the straight line

Let C be particle concentration corresponding to x particles in 1 ml. If this 1 ml is placed on a microscope grid over a constant area K

$$C = \frac{x}{K} \quad (1)$$

Calculation of the concentration giving one particle per field (S = area of microscope field) :

$$C = \frac{1}{S}; \quad \frac{x}{K} = \frac{1}{S} \quad \text{or} \quad x = \frac{K}{S} \quad (2)$$

The relation becomes linear when expressed in double-log form : $\log x = \log K - \log S$.

A linear relationship thus exists between the Log of the microscope field area (Log of the magnification) and the Log of the concentration giving one particle per field (CAUDWELL, 1978).

— d'insectes infectieux utilisables pour les extraits infectieux,
— d'insectes sains pour les extraits témoins.

C. L'extraction des MLO à partir des cicadelles infectieuses

La méthode de base a été publiée pour l'essentiel (CAUDWELL *et al.*, 1978, 1982).

Le milieu d'extraction choisi est normalement ajusté à pH 7 et stérilisé par une filtration sur membrane

(pores < 220 nm). 36 cicadelles infectieuses entières sont broyées dans 6 ml de milieu à l'aide d'un potter à main en verre avec piston en téflon, calibré pour un espace potter/piston de 0,1 mm.

Le broyat est soumis à une clarification dans une centrifugeuse horizontale à 2 900 g pendant 5 mn. Cette accélération est appliquée au fond des tubes qui ne sont remplis que sur une hauteur inférieure à 2 cm. Toutes ces opérations sont réalisées à + 4 °C.

Le surnageant est préfiltré sur 2 disques en fibre de verre disposés en série sur le même support, de façon que l'extrait traverse d'abord le plus grossier (Whatman GFA), puis le plus fin (Whatman GFF). Il est ensuite filtré sur une membrane (pores 450 nm) afin d'éliminer les bactéries intestinales des cicadelles qui sont mortelles pour l'insecte, lorsqu'elles lui sont injectées (fig. 2). Le diamètre des préfiltres et filtres est de 2,5 cm. Il a été déterminé de façon à ce qu'il n'y ait aucun colmatage.

C'est l'inféctivité de ce *filtrat* qui est éprouvée par l'épreuve d'inféctivité pour toutes les expériences (fig. 2).

Figure 2

Schéma de l'extraction des MLO infectieux à partir des cicadelles infectieuses.

Scheme of MLO extraction from infectious leafhoppers.

D. L'épreuve d'inféctivité

L'épreuve d'inféctivité consiste à injecter l'extrait infectieux à 30 jeunes cicadelles *E. variegatus* saines. On inocule des insectes mâles, car ils donnent des résultats précis et, chez cette espèce, les mâles sont des vecteurs plus efficaces que les femelles (C. KUSZALA, 1986). La méthode d'inoculation a été décrite (CAUDWELL *et al.*, 1977). Les insectes inoculés sont mis en incubation sur 2 fèves (*Vicia faba* var. « Strube ») pendant 3 semaines. Ils sont ensuite répartis à raison de 3 par plante sur de jeunes fèves saines (var. « Arla ») pour un séjour d'une semaine (parfois 2). A l'issue de ce temps, les plantes sont traitées avec un insecticide et placées en serre en conditions favorables

à la manifestation des symptômes. Nous utilisons une serre refroidie par « cooling », non ombrée, munie d'un éclairage d'appoint mixte incandescence et fluorescence, complétant la longueur hivernale du jour à 16 h.

Les résultats obtenus en proportion de plantes devenues malades peuvent être convertis en nombre d'unités infectieuses (UI) par ml, (CAUDWELL, 1977 ; CAUDWELL & KUSZALA, 1984).

III. RÉSULTATS

A. Les milieux d'extraction et de survie

De très nombreux milieux ont été éprouvés pendant plus de 10 ans, pour extraire l'inféctivité des cicadelles *E. variegatus* des élevages infectieux. Pour leur sélection, nous avons utilisé systématiquement la méthode d'extraction (fig. 2) et l'épreuve d'inféctivité, tels qu'ils sont décrits ci-dessus.

Plusieurs groupes de milieux ont été éprouvés :

- 1) Des solutions salines ou sucrées : nous citerons :
 - le solvant 3 (BRASSE *et al.*, 1953),
 - la solution de RINGER, additionnée ou non de sucres (glucose ou saccharose),
 - des variantes diversement tamponnées de ces solutions, de pH ou de pression osmotique divers.
- 2) Des milieux de culture des mycoplasmes ou des spiroplasmes :
 - milieu de HAYFLICK (1965),
 - milieu Mycoplasmes de l'Institut Pasteur (Dr TRAM)*,
 - milieu de TAYLOR-ROBINSON (MANCHEE & TAYLOR-ROBINSON, 1968),
 - milieux MI 71 U, M II 71, M II 71 U, etc... (GIANNOTTI, 1972),
 - milieu NHS (= FF 74) - (ROSENDAL, Comm. pers, 1974),
 - milieu ABD EL SHAFY *et al.*, (1973),
 - milieu M1_A (JONES *et al.*, 1977),
 - milieu SAGLIO (SAGLIO *et al.*, 1971).
 - milieu C - 3 (CHEN & LIAO, 1975),
 - milieu C - 3G (LIAO & CHEN, 1977).

Ces milieux ont été complétés avec du sérum de veau foetal ou du sérum de poulain, chauffé ou non chauffé. Plusieurs origines d'extraits de levure ont été éprouvées : levure diététique (*), extrait préparé avec de la levure de boulangerie, Yeast extract et Yeast olate de Gibco, etc...).

- 3) Des milieux de culture de cellules de Vertébrés :
 - le milieu de base de EAGLE complété par du sérum et de l'extrait de levure (Gibco),
 - le milieu essentiel minimum de EAGLE (Gibco),
 - le milieu 199 de MORGAN (Eurobio),
 - le milieu 199 sans sel et sans sucre (Eurobio) complété en sels de K et de Mg, selon les concentrations de ces ions dans les extraits de cicadelles,
 - le milieu HAM-F₁₀ complet (Gibco),

(*) Nous remercions le Dr TRAM pour les essais faits avec le milieu de l'Institut Pasteur.

(*) Levure diététique « Cereal » production Cerea - Vissenty 07 ANNONAY France.

- le milieu NCTC 135 (Eurobio),
- le milieu CMRL 1066 (Gibco),
- le milieu (A₂ + APG) (Gibco).
- 4) Des milieux de culture de cellules d'invertébrés :
 - le milieu de SCHNEIDER (1964) pour *Drosophila* (Gibco),
 - le milieu de culture d'Amphibiens (Gibco),
 - le milieu d'HIRUMI & MARAMOROSCH (1964 et 1967),
 - le milieu MITSUHASHI & MARAMOROSCH (1964),
 - les milieux MGM 401 et MGM 431 (MITSUHASHI, 1971 et 1972),
 - le milieu de GRACE (Eurobio),
 - le milieu de GRACE modifié (Gibco) contenant 82 p. 100 de milieu de Grace, 10 p. 100 d'ultrafiltrat d'œuf complet, 7 p. 100 de sérum de veau fœtal et 1 p. 100 de sérum bovine Albumine.
 - le milieu de CHIU & BLACK (1967),
 - le milieu de MARTINEZ-LOPEZ & BLACK (1974),
 - le milieu de LIU & BLACK (1976).

5) Des milieux inspirés des formulations nécessaires à la nutrition des cicadelles :

- le milieu DIET de HOU & BROOKS (1975),
- et des variations de ce milieu.

6) Des sèves de végétaux :

- Coconut phloem Sap (Mc COY, 1976 et 1977),
- lait de noix de coco,
- sève d'érable (1^{re} sève printanière),
- sève de bouleau (1^{re} sève printanière),
- sève de vigne (1^{re} sève printanière prélevée par notre laboratoire).

Ces 3 dernières sèves sont prélevées au début du printemps dans les vaisseaux du bois. Mais très riches en sucre, elles sont supposées voisines de la composition de la sève élaborée du liber dont se nourrissent les cicadelles.

7) Des milieux complémentés :

Les milieux précédents ont été également éprouvés après substitution ou complémentation de certains éléments.

Plusieurs types d'éléments ont été éprouvés :

a) Des composés chimiques définis :

- arginine et glutamine,
- acides organiques,
- antioxydants (cystéine, glutathion, acide ascorbique),
- tampons (histidine base et chlorhydrate, et autres),
- solutions stock de vitamines hydrosolubles et liposolubles,
- solution définie d'acides aminés, calquée sur l'analyse de l'hémolymphe des cicadelles *E. variegatus* (tabl. 1).

b) Des extraits de tissus de vertébrés :

- solutions d'acides nucléiques,
- liquide allantoïdien,
- liquide amniotique,
- jaune d'œuf ou « Whole egg ultrafiltrate » (Gibco),
- solutions stocks de bactériologie : PPLO Broth, Nutrient broth, Beefheart, tryptone, peptone, Brain heart (Difco).

TABEAU 1

Composition en acides aminés* de l'hémolymphe des cicadelles *E. variegatus* (mg/l).

C'est la solution 10 fois concentrée par rapport à cette composition qui entre dans la formulation de notre solution mère (tabl. 2).
Amino acid composition of the hemolymph of *E. variegatus*.

mg/l		mg/l	
ASP	8,10	VAL	36,90
THR	76,55	MET	16,92
SER	23,83	ILEU	19,83
ASP NH ₂	29,01	LEU	32,51
GLU	18,54	TYR	56,31
GLU NH ₂	253,51	PHE	18,04
PRO	196,32	LYS	37,59
GLY	9,77	HIS	89,81
ALA	140,69	ARG	35,12

* Cette analyse a été faite dans notre laboratoire par VALLÉE J. C. et PREVOST J., à l'analyseur Technicon. Nous tenons à les remercier.

c) Des extraits d'invertébrés :

- hémolymphe d'insectes (*Anthraea pernyi* Guer, *Eudia pavonia* L, et *Locusta migratoria* L), (¹).
- hémolymphe de homard,
- extraits de cicadelles saines (*E. variegatus* adulte),
- extraits de larve de *E. variegatus*.

d) Des extraits de végétaux :

- lait de coco,
- sèves de végétaux (Coconut Phloem Sap, sève d'érable, de bouleau et de vigne),
- extrait de liber de racines de carotte (*Daucus carota*).

8) Les meilleurs résultats ont été obtenus avec des milieux composés de plusieurs formulations élémentaires, éventuellement complémentées.

Le milieu 1379 (tabl. 2) permet une bonne extraction et une bonne survie de l'agent pathogène (MLO). Nous ne notons aucune baisse de l'infectivité au bout de 44 h, le temps le plus long éprouvé avec ce milieu. Il est utilisé pour les opérations de purification qui ont une certaine durée et pour les dilutions faites avant l'épreuve d'infectivité. Il a l'inconvénient de contenir beaucoup de liquides biologiques de composition complexe mal définie (albumine de sérum bovin, ultrafiltrat d'œuf entier, sérum) et beaucoup de protéines qui viennent encombrer les essais de purification et d'immunochimie.

C'est pour cette raison que nous avons composé le milieu 1464, qui est dépourvu de protéine et de tout composé complexe (tabl. 2). Il permet une bonne extraction des MLO mais non leur survie. Il est utilisé essentiellement pour l'immunisation des lapins et pour la production de sérums.

B. La méthode de comparaison des milieux

L'amélioration des milieux d'extraction et de survie, poursuivie pendant plus de 10 ans, a permis de faire

(¹) Ces insectes ont été élevés dans notre insectarium à partir d'œufs fournis par OPIE La Minière BP 121 78003 VERSAILLES. Nous remercions cet organisme.

TABLEAU 2
Les meilleurs milieux.
Composition of the best media for grapevine flavescence dorée MLO.

	Solution mère	1 034	1 226	1 271	1 342	1 377	1 332	1 328	1 348	1 379	1 464
KCl 40 mg/ml	4 ml										
Mg Cl ₂ 6H ₂ O : 33 mg/ml	4,5										
Solut. d'ac. aminés du Tableau I concentrée 10 x	4										
Ac. succinique : 531 mg/10 ml	10	5,1		0,7	0,7	0,7					
Extrait de levure : 500 mg/10 ml	10										
Sérum de veau fœtal	17,5										
KH ₂ PO ₄ : 27 mg/ml	1										
	51 ml										
Sirop érable		0,15									
NCTC 135				2	2	2	2	1,5	1,5	2	2
Milieu de Grace				4			4				5
Grace modifié					4	4		4	4	4,2	
Sérum de veau fœtal			1,75	1	1	1	1	1,5	1,5	1,3	
Eau bidistillée		4,9	7,6	0,3	0,3	0,3	3	3	1	2,5	3
Extrait de levure 50 mg/ml			0,5								
Milieu 1226 (décrit dans ce tableau)				2	2				2		

passer la concentration du « Filtrat » (fig. 2) de 10^3 à 10^7 unités infectieuses par ml.

Ainsi, dans les débuts, chaque milieu devait être éprouvé par une extraction différente (fig. 2). Ceci avait l'inconvénient d'occasionner des fluctuations dues aux aléas de l'extraction et rendait les comparaisons aléatoires. Lorsque la dilution a pu atteindre 1/50 ou 1/100, il fut possible de diluer chaque filtrat dans de nombreux milieux, comme cela se fait en bactériologie (fig. 3). Les comparaisons ont gagné en rapidité et en précision.

Une nouvelle limitation s'est manifestée à partir de ce moment au niveau de l'épreuve d'infectivité elle-même. Il était difficile pour un même opérateur d'injecter plus de 120 cicadelles à la suite (4 épreuves d'infectivité). D'autre part, les derniers milieux injectés étaient mis en attente et se trouvaient défavorisés par rapport aux premiers. Il fut possible de surmonter cette difficulté par la congélation des extraits et des dilutions.

C. La congélation des extraits et des dilutions

Notre laboratoire disposait donc de « filtrats » très infectieux. Il a paru intéressant d'éprouver le maintien de l'infectivité dans ces filtrats congelés à -20°C ou à -80°C .

Les filtrats, d'infectivité connue, ont été mis en tubes de polystyrène fermés et placés au congélateur. Au bout du temps choisi, les filtrats sont décongelés et injectés à des cicadelles saines pour une nouvelle épreuve d'infectivité.

Comme nous l'avons déjà souligné par ailleurs, l'agent de la flavescence dorée semble plus fragile que celui de la phyllodie du trèfle ou de l'aster yellows. Les filtrats conservés à -20°C perdent leur infectivité au bout de quelques jours. Par contre, les filtrats congelés à -80°C et maintenus à cette température, peuvent se conserver pendant plus de 2 années sans perdre leur infectivité. Cependant, les résultats dépendent du milieu dans lequel les MLO sont congelés.

Figure 3

Méthode de comparaison de nombreux milieux avec un même filtrat.

Comparison method of numerous media with the same extraction.

Importance du milieu sur la conservation des MLO en congélation

Nos premiers résultats de congélation des MLO ont été irréguliers. Nous obtenions une bonne conservation des filtrats dans tous les cas, mais des résultats irréguliers avec les dilutions. Il est apparu qu'il y avait une bonne conservation de l'infectivité dans les cas suivants :

Filtrat pur ou peu dilué (au 1/10 maximum)

Dilutions dans le milieu 1379

Dilution dans le milieu 1464 enrichi en extrait de cicadelle. L'infectivité se conservait mal dans le milieu 1464 utilisé pur.

On peut donc dire que l'infectivité se maintient en congélation dans le milieu 1379 qui contient du sérum et du milieu de Grace modifié qui apporte de l'ultrafiltrat d'œuf complet et de l'albumine de sérum bovin. On ignore lequel de ces 3 éléments est indispensable. Elle se maintient également dans le milieu 1464 lorsque celui-ci contient de l'extrait de cicadelle saine ou lorsqu'il s'agit d'un filtrat. Dans ce dernier cas, il est riche en extrait de cicadelle. L'extrait de cicadelle est donc susceptible de remplacer l'élément indispensable contenu dans le milieu 1379.

Il résulte de cette analyse que c'est probablement le sérum qui est indispensable à la conservation des MLO congelés. En l'absence de sérum, l'hémolymphe des cicadelles pourrait jouer le même rôle protecteur.

D. La clarification et la sédimentation des MLO

Pour parvenir à une purification partielle des MLO, il est essentiel de savoir dans quelles limites d'accélération ils sédimentent. Il est nécessaire de connaître ces limites de façon pratique, c'est-à-dire en admettant une certaine marge considérée comme négligeable. Il est nécessaire également de resserrer au maximum ces limites de façon à éliminer le plus possible de débris lourds par la clarification et de protéines légères lors de la sédimentation.

Nous avons travaillé sur des tubes peu remplis (2 cm maxi) de façon à prendre en compte l'accélération du rotor appliquée au fond du tube. Les centrifugations ont été comparées selon le produit ($g \times mn$) qui exprime l'accélération du rotor au fond du tube multipliée par le nombre de minutes. Après chaque centrifugation, le sédiment et le surnageant sont tous les 2 soumis à l'épreuve d'infectivité afin d'estimer ce qui est conservé et ce qui est perdu. Les sédimentations sont faites à 4 °C et comparées selon la méthode rapportée dans la fig. 3.

1. La clarification des extraits

Nos premiers essais avaient déterminé que la centrifugation horizontale à $2\,900\,g \times 5\,mn$ ne faisait perdre qu'une quantité négligeable de l'infectivité. En se limitant à 2 cm de hauteur de liquide (4 ml environ), on obtenait des extraits clarifiés qui passaient sans colmatage dans les préfiltres et filtres de 2,5 cm de diamètre. Mais toute augmentation du volume traité conduisait au colmatage et obligeait à augmenter les surfaces de filtration (filtres de 4,7 cm par exemple). Or lorsque nous avons abordé les méthodes immuno-chimiques, nous avons été amenés à augmenter considérablement les volumes d'extraits nécessaires par exemple à l'immunisation des lapins.

Nous avons tenté dans un premier temps d'obtenir des filtrats plus clairs (moins colmatants), sans perte notable d'infectivité. Des résultats satisfaisants ont été obtenus avec :

$$2\,900\,g \times 15\,mn = 43\,500\,g.mn$$

$$2\,900\,g \times 20\,mn = 58\,000\,g.mn$$

Dans un second temps, nous avons cherché à augmenter les volumes en dépassant les 2 cm au fond du tube par l'utilisation d'un rotor angulaire. Nous avons tenté parallèlement de diminuer la durée de la centrifugation qui est toujours un facteur limitant pour le maintien de l'infectivité.

Ainsi, de bons résultats ont été obtenus en rotor angulaire en tubes pleins avec

$$14\,500\,g \times 5\,mn = 72\,500\,g.mn$$

$$17\,300\,g \times 5\,mn = 86\,500\,g.mn$$

Il est souhaitable dans ces cas, pour obtenir un culot solide bien détaché du surnageant, de faire précéder cette centrifugation par une autre plus grossière, à moindre vitesse, par exemple en tubes pleins : $2\,900\,g \times 5\,mn$, destinée à éliminer les déchets les plus grossiers.

2. La sédimentation de l'infectivité

La sédimentation de l'infectivité doit satisfaire 2 exigences :

— sédimenter toute l'infectivité, de façon qu'il ne s'en retrouve que très peu dans le surnageant.

— purifier au maximum les MLO en sédimentant, avec eux, le moins possible de protéines légères.

Nous avons donc intérêt à utiliser la sédimentation la plus faible possible qui retient toute l'infectivité. Toutes les valeurs de g que nous donnerons s'appliquent au fond des tubes qui ne sont remplis que sur 2 cm.

La sédimentation de l'infectivité a été obtenue régulièrement sans pertes notables dans le surnageant, à $13\,300\,g \times 30\,mn = 399\,000\,g.mn$.

Il est possible de réduire le temps de centrifugation en augmentant l'accélération. Ainsi, de bons résultats ont été obtenus :

$$\text{à } 17\,000\,g \times 20\,mn = 340\,000\,g.mn$$

$$\text{à } 20\,200\,g \times 15\,mn = 303\,000\,g.mn$$

Tous les essais visant à descendre au-dessous de $300\,000\,g.mn$ conduisent à perdre une partie de l'infectivité dans le surnageant.

Il peut être intéressant par contre d'augmenter le nombre de $g.mn$ dans le but d'augmenter le remplissage des tubes et le volume traité. Ceci a, nous le savons, comme inconvénient d'augmenter la quantité de protéines légères dans le culot. Une bonne sédimentation de l'infectivité a été obtenue à :

$$13\,300\,g \times 40\,mn = 532\,000\,g.mn$$

$$13\,300\,g \times 90\,mn = 1\,197\,000\,g.mn$$

$$20\,200\,g \times 90\,mn = 1\,818\,000\,g.mn$$

$$23\,500\,g \times 30\,mn = 705\,000\,g.mn$$

$$27\,000\,g \times 15\,mn = 405\,000\,g.mn$$

$$34\,800\,g \times 15\,mn = 522\,000\,g.mn$$

Il apparaît que les MLO résistent bien à l'écrasement.

En résumé, nous avons été amenés à pratiquer 2 clarifications successives en tubes pleins à $2\,900\,g \times 5\,mn$, puis $17\,300\,g \times 5\,mn$ et une sédimentation à $13\,300\,g \times 30\,mn = 399\,000\,g.mn$. Nous réduisons ainsi au maximum l'écart entre la clarification et la sédimentation, pour obtenir une purification optimale. La méthode finalement retenue est résumée dans la figure 4.

IV. DISCUSSION ET CONCLUSIONS

Au cours d'un travail de plus de 10 années, il a été possible d'améliorer l'infectivité des filtrats obtenus à partir d'extraits de cicadelles infectieuses *E. variegatus*.

Figure 4

Méthode normalisée d'extraction et de purification partielle des MLO infectieux à partir des cicadelles infectieuses.

Standardized method of extraction and of partial purification of the MLO from infectious leafhoppers.

Dans un premier temps, nous avons éprouvé les molécules nécessaires ou défavorables. Les ions K^+ et Mg^{+} sont apparus nécessaires, tandis que les ions Na^+ et Cl^- sont défavorables. Ce problème a déjà été évoqué (CAUDWELL *et al.*, 1974). Les proportions des acides aminés ont été étudiées. L'hydrolysate de lactalbumine, souvent utilisé (milieu de CHIU et BLACK, 1967 ; milieu de MARTINEZ-LOPEZ & BLACK, 1977 ; milieu 747 de CAUDWELL *et al.*, 1974 ; etc...) est avantageusement remplacé par une solution définie d'acides aminés, calquée sur l'analyse de l'hémolymphe des cicadelles *E. variegatus* (tabl. 1). Nous avons vérifié que l'eau est également préférable à cet hydrolysate. Celui-ci semble donc contenir un composé toxique pour les MLO. Il s'agit probablement de l'ammoniaque qui s'y trouve toujours en quantités appréciables. Nous avons vérifié que notre solution d'acides aminés (tabl. 1) est également préférable aux diverses solutions aminées généralement utilisées pour la culture des bactéries ou des mycoplasmes : extraits de cœur, de cerveau, peptone, tryptone, PPLO broth, etc... Ces considérations ont conduit à la formulation d'une solution mère (tabl. 2, 1^{re} colonne) qui a été utilisée, diluée ou complétée par divers additifs.

Dans un second temps, nous avons tenté le mélange de plusieurs milieux les plus satisfaisants.

Ces 2 lignes de recherche partiellement convergentes ont amené à la formulation des milieux qui ont donné les meilleurs résultats (tabl. 2). Parmi cet ensemble,

nous avons retenu, pour les travaux de routine, les milieux 1379 et 1464. Le premier qui est riche en composés complexes (sérum, ultrafiltrat d'œuf entier, sérum albumine bovine) est favorable aux survies, aux dilutions et aux congélations. Le second, qui ne possède pas ces composés complexes, se prête mieux à l'immunisation des lapins.

L'utilisation de filtrats très infectieux a rendu possible la comparaison des milieux selon les méthodes de la bactériologie. Les résultats des épreuves d'infectivité ne sont en effet exploitables que si l'on obtient plus de 0 p. 100 de plantes malades et moins de 100 pour 100 (CAUDWELL, 1977). Ceci implique que les filtrats soient convenablement dilués avant leur injection aux cicadelles. Les premiers filtrats (concentration 10^3 UI/ml) devaient donc être injectés non dilués aux cicadelles. Au fur et à mesure de l'amélioration des résultats, il est devenu possible de diluer les extraits au 1/5, puis au 1/10 et enfin au 1/50 et au 1/100 avant l'injection. Nous pouvons ainsi désormais diluer une même extraction dans de nombreux milieux avant l'épreuve d'infectivité, ainsi qu'il est courant de le faire en bactériologie (fig. 3).

La bibliographie rapporte la survie de l'agent pathogène des jaunisses à l'intérieur des tissus des cicadelles congelées. MUSIL (1964) a maintenu ainsi infectieux l'agent du stolbur pendant 22 j. à $-28^\circ C$. CHYKOWSKI (1977) rapporte la bonne survie de l'agent de l'aster yellows dans sa cicadelle vectrice à -28° et $-64^\circ C$, pour des temps allant jusqu'à 21 semaines. L'agent de l'aster yellows, maintenu ainsi dans sa cicadelle vectrice n'a rien perdu de son infectivité en 104 semaines (2 années).

Il était plus intéressant encore de tenter la congélation des MLO, non plus dans les cicadelles infectieuses, mais dans les extraits. Nous avons montré que nos filtrats et leurs dilutions au 1/50 peuvent être conservés congelés à $-80^\circ C$ pendant 2 ans au moins, sans perdre de leur infectivité, à condition qu'elles contiennent les composés complexes du milieu 1379 (sérum), ou de l'extrait de cicadelle. Il est donc recommandé de diluer les extraits dans ce milieu pour les conserver congelés à $-80^\circ C$.

La sédimentation des MLO a été étudiée, selon les résultats des épreuves d'infectivité. Un protocole de purification partielle a été présenté qui met en œuvre 2 clarifications successives, une double préfiltration, une filtration et une sédimentation (fig. 4).

L'amélioration des méthodes d'extraction et de purification des MLO a donné à notre laboratoire la possibilité d'accéder, d'une part, aux recherches sur la purification des membranes et, d'autre part, aux méthodes immunochimiques. Elle a ainsi permis la première visualisation par immunosorbant électromicroscopie (ISEM) de l'agent pathogène des jaunisses en milieu liquide (CAUDWELL *et al.*, 1982). Elles ont également permis d'accéder à la détermination des MLO par la méthode ELISA et par immunofluorescence (BOUDON *et al.*, 1986). C'est là, pensons-nous, une étape dans notre connaissance des jaunisses à mycoplasmes des plantes.

Reçu le 17 février 1986.

Accepté le 20 juillet 1986.

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Abd El Shafy, Fudl-Allah, Calavan E. C., 1973. Effect of temperature and pH on growth *in vitro* of a mycoplasma-like organism associated with stubborn disease of citrus. *Phytopathology*, **63** (2), 256-259.
- Boudon-Padieu E., Terwisscha Van Scheltinga T., Lherminier J., Caudwell A., 1986. Elisa and immunofluorescence (IF) detection of the MLO agent of grapevine flavescence dorée (FD) on individual Leafhopper vector. 6th International Congress of the International Organization for Mycoplasma, Birmingham, Alabama, U.S.A., 26-31 August 1986.
- Brakke M. K., Maramorosch K., Black L. M., 1953. Properties of the wound tumor virus. *Phytopathology*, **43**, 387-390.
- Caudwell A., 1977. Aspects statistiques des épreuves d'infectivité chez les jaunisses (yellow's) des plantes et chez les viroses transmises selon le mode persistant. Intérêt de la fève (*Vicia faba*) comme plante-test pour les jaunisses. *Ann. Phytopathol.*, **9**, 141-159.
- Caudwell A., 1978. L'étiologie des jaunisses des plantes. *Phytoma, Déf. cultures*, **294**, 5-9.
- Caudwell A., Kuszala C., 1984. Bioassay techniques to assess plant pathogenicity of mycoplasma-like-organisms (MLO). *Ann. Microbiol. (Inst. Pasteur)*, **135** A, 255-261.
- Caudwell A., Larrue J., 1977. La production de cicadelles saines et infectieuses pour les épreuves d'infectivité chez les jaunisses à mollicutes des végétaux. L'élevage de *Euscelidius variegatus* KBM et la ponte sur mousse de polyuréthane. *Ann. Zool. Ecol. Anim.*, **9**, 443-456.
- Caudwell A., Kuszala C., Bachelier J. C., Larrue J., 1970a. Transmission de la flavescence dorée de la vigne aux plantes herbacées par l'allongement du temps d'utilisation de la cicadelle *Scaphoideus littoralis* Ball et l'étude de sa survie sur un grand nombre d'espèces végétales. *Ann. Phytopathol.*, **2** (2), 415-428.
- Caudwell A., Kuszala C., Larrue J., Bachelier J. C., 1970b. Transmission de la flavescence dorée de la fève à la fève par des cicadelles des genres *Euscelis* et *Euscelidius*. Intervention possible de ces insectes dans l'épidémiologie du Bois noir en Bourgogne. Congr. of Intern. Council studies virus and virus diseases of grape. *Ann. Phytopathol.*, I.N.R.A. Paris, n° hors série, 1972, 181-189.
- Caudwell A., Kuszala C., Larrue J., 1974. Sur la culture *in vitro* des agents infectieux responsables des jaunisses des plantes (MLO). *Ann. Phytopathol.*, **6** (2), 173-190.
- Caudwell A., Bachelier J. C., Kuszala C., Larrue J., 1977. Un appareil permettant d'immobiliser les insectes à injecter dans les épreuves d'infectivité des jaunisses. *Ann. Phytopathol.*, **9** (4), 521-523.
- Caudwell A., Kuszala C., Larrue J., Fleury A., 1978. Recherche d'un milieu liquide d'extraction, de survie et éventuellement de culture pour l'agent infectieux (mycoplasme) de la flavescence dorée. Proc. 6th Conf. Virus and Virus disease of the grapevine. *Monographias INIA*, **18**, 231-235.
- Caudwell A., Meignoz R., Kuszala C., Larrue J., Fleury A., Boudon E., 1982. Purification sérologique et observation ultramicroscopique de l'agent pathogène (MLO) de la flavescence dorée de la vigne dans les extraits liquides de fèves (*Vicia faba*) malades. *C.R. Séances Soc. Biol.*, **176**, 5, 723.
- Chen T.A., Liao G. H., 1975. Corn stunt spiroplasma : isolation, cultivation and proof of pathogenicity. *Science*, **188**, 1015-1017.
- Chiu R. J., Black L. M., 1967. Monolayer cultures of insect cell lines and their inoculation with a plant virus. *Nature*, **215**, 1076-1078.
- Chiykowski L. N., 1977. Cryopreservation of aster yellows agent in whole leafhoppers. *Can. J. Microbiol.*, **23**, 8.
- Doi Y., Teranaka M., Yora K., Asuyama H., 1967. Mycoplasma or PLT group-like microorganisms found in the phloem elements of plants infected with mulberry dwarf, potato witches'-broom. *Ann. Phytopathol. Soc. Jpn.*, **33**, 259-266.
- Giannotti J., 1972. La culture « in vitro » des mycoplasmes de plantes et leur transmission par des vecteurs. *Med. Fak. Landb. Gent.*, **37** (2), 429-440.
- Hayflick L., 1965. Tissue cultures and mycoplasmas. *Tex. Rep. Biol. Med.*, **23** (Suppl. 1), 285-303.
- Hirumi H., Maramorosch K., 1964. The *in vitro* cultivation of embryonic leafhopper tissues. *Exp. Cell. Res.*, **36**, 625-631.
- Hirumi H., Maramorosch K., 1967. Electron microscopy of wound tumor virus in cultured embryonic cells of the leafhopper *Macrostes fascifrons*. 2nd int. Coll. in « Invertebrate tissue culture », Como, 9-10 September 1967.
- Hou R. F., Brooks M. A., 1975. Continuous rearing of the aster leafhopper, *Macrostes fascifrons*, on a chemically defined diet. *J. insect Physiol.*, **21**, 1481-1483.
- Jones A. L., Whitcomb R. F., Williamson D. L., Coan M. E., 1977. Comparative growth and primary isolation of spiroplasmas in media based on insect tissue culture formulations. *Phytopathology*, **67** (6), 738-746.
- Kuszala C., 1986. Influence du sexe et de l'âge des insectes vecteurs injectés dans l'épreuve d'infectivité des jaunisses des plantes. Mesure radiologique du volume injecté à *Euscelidius variegatus*. *Agronomie*, **8** (6), 591-598.
- Liao C. H., Chen T.A., 1977. Culture of corn stunt spiroplasma in a simple medium. *Phytopathology*, **67**, 6, 802-807.
- Liu H. Y., Black L. M., 1976. Improvements in establishing and growing leafhopper cell cultures. *Proc. Am. Phytopathol. Soc.*, **3**, 234-235.
- Mc Coy R. E., 1976. Plant phloem sap : a potential mycoplasma growth medium. *Proc. Soc. for Gen. Microbiol.* vol. III, **4**, 155.
- Mc Coy R. E., 1977. Growth of mycoplasmas in phloem sap from lethal yellowing resistant Malayan dwarf coconut palm. *Proc. Am. Phytopathol. Soc.*, **4**, 108.
- Manchee R. J., Taylor Robinson D., 1968. Haemadsorption and haemagglutination by mycoplasmas. *J. Gen. Microbiol.*, **50**, 465.
- Martinez-Lopez G., Black L. M., 1974. New medium and conditions for the culture of monolayers of agallian leafhopper cells used in studies of certain plant viruses. *Phytopathology*, **64**, 1040-1041.
- Martinez-Lopez G., Black L. M., 1977. Development of a new medium for the culture of agallian leafhopper cells. *In vitro* **13**, 777-784.
- Mitsuhashi J., 1971. Subculturing of cells from the embryo of the green rice leafhopper, *Nephotettix cincticeps* Uhler. *Annot. Zool. Jpn.*, **48**, 139-147.
- Mitsuhashi J., 1972. Primary culture of the haemocytopoietic tissue of *Papilio xuthus*. *Jap. J. Appl. Entomol. Zool.*, **7** (1), 39-41.
- Mitsuhashi J., Maramorosch K., 1964. Leafhopper tissue culture : embryonic, nymphal, and imaginal tissues from aseptic insects. *Contrib. Boyce Thompson Inst.*, **22**, 435-460.
- Musil M., 1964. Persistence of infectivity of yellows type viruses in frozen viruliferous leafhoppers. *Acta virologica*, **8**, 92.
- Saglio P., Laffèche D., Bonissol C., Bové J. M., 1971. Isolement, culture et observation au microscope électronique des structures de type mycoplasme associées à la maladie du Stubborn des agrumes et leur comparaison avec les structures observées dans le cas de la maladie du greening des agrumes. *Physiol. Vég.*, **9**, 569-582.
- Schneider I., 1964. Differentiation of larval drosophila eye-antennal discs *in vitro*. *J. Exp. Zool.*, **156**, 91-104.
- Sinha R. C., 1974. Purification of mycoplasma-like organisms from china aster plants affected with clover phyllody. *Phytopathology*, **64**, 1156-1158.
- Sinha R. C., Benhamou N., 1983. Detection of mycoplasma like organism antigens from aster yellows-diseased plants by two serological procedures. *Phytopathology*, **73**, 1199-1202.