



HAL
open science

Microscopie et interactions hôtes/micro-organismes

Jeannine Lherminier, Marie Huyez-Levrat

► **To cite this version:**

Jeannine Lherminier, Marie Huyez-Levrat. Microscopie et interactions hôtes/micro-organismes. Cahier des Techniques de l'INRA, 2011, N° Spécial: Microscopie. hal-04792234

HAL Id: hal-04792234

<https://hal.inrae.fr/hal-04792234v1>

Submitted on 20 Nov 2024

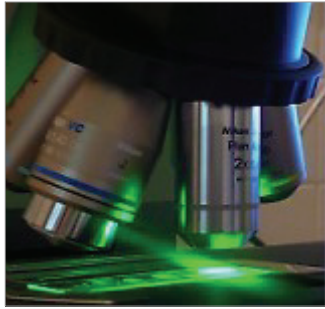
HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

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.



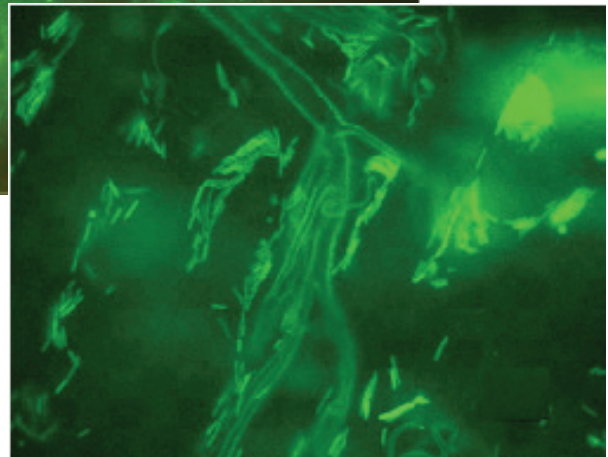
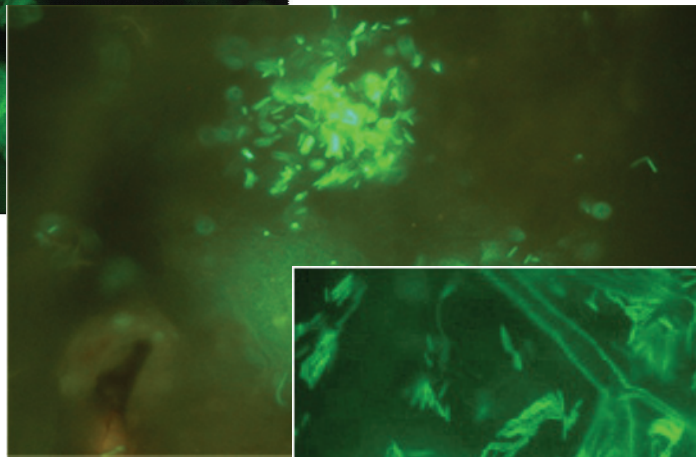
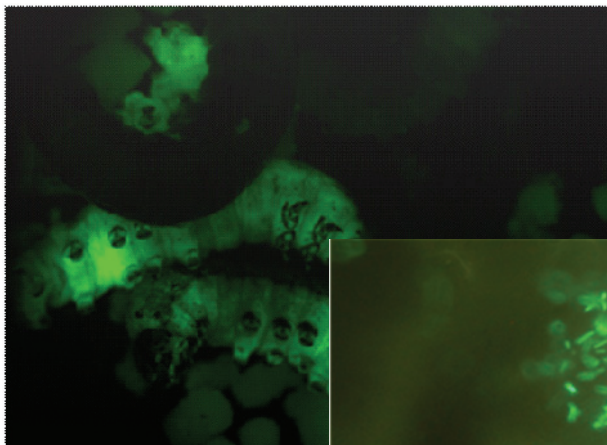
Distributed under a Creative Commons Attribution - ShareAlike 4.0 International License

Le Cahier des Techniques de l'Inra



Microscopie
et interactions

hôtes / micro organismes



Délégation au Partenariat avec les Entreprises

Institut national de la recherche agronomique - 147 rue de l'Université - F-75338 Paris Cedex 07

Microscopie et interactions hôtes/micro-organismes

Collectif ¹

Responsable scientifique : *Jeannine Lherminier*²
Coordonnatrice : *Marie Huyez-Levrat*³

Sommaire

- Introduction de *Jeannine Lherminier* p. 03
- La fluorescence : solution pour exploiter les résultats d'expression de gènes bactériens dans une larve d'insecte infecté, *Sylvie Pagès, Anne Lanois, Nadège Ginibre* p. 05
- Localisation et visualisation de transcrits fongiques *in situ* : une méthode originale qui combine biologie moléculaire et microscopie confocale, *Christine Arnould, Marie Tollot, Pascale Seddas, Vivienne Gianinazzi-Pearson* p. 15
- Évaluation de la fluidité de la membrane plasmique avec la sonde fluorescente di-4-ANEPPDHQ : adaptation de la technique de recouvrement de fluorescence après photoblanchiment (FRAP) sur cellules végétales en suspension, *Christophe Der* p.23
- Apport de l'imagerie cellulaire à l'étude des interactions entre la bactérie intraphloémique *Spiroplasma citri* et les cellules de son insecte vecteur *Circulifer haematoceps*, *Brigitte Batailler et Nathalie Arricau-Bouvery* p. 31
- Voyage au centre du puceron : Observation par microscopie électronique à transmission de particules virales dans le tube digestif et les glandes salivaires accessoires, *Catherine Reinbold* p. 43
- Quantifier en microscopie : Adaptation d'une méthode de comptage à la caractérisation de différences biologiques, *Laure Avoscan* p. 51

Cet ouvrage est téléchargeable à partir du site de l'Inra

https://intranet.inra.fr/cahier_des_techniques

¹ *Le Cahier des Techniques de l'Inra* est une publication destinée à échanger des méthodes et des savoir-faire. Ce n'est pas une revue à Comité de lecture. Les auteurs sont seuls responsables de leurs textes.

² Responsable du Centre de Microscopie INRA/Université de Bourgogne - Plateforme DImaCell (Dispositif Interrégional d'Imagerie Cellulaire) - UMR1088 PME – Plante microbe environnement – INRA- F-21065 Dijon Cedex

☎ 03 80 69 35 43 ✉ jeannine.lherminier@dijon.inra.fr

³ UAR1185 DV/DPE - Délégation au partenariat avec les entreprises - INRA - F-75338 Paris Cedex 07

☎ 01 42 75 91 65 ✉ marie.huyez@paris.inra.fr

Introduction

*Jeannine Lherminier*¹

La biologie cellulaire contribue de façon essentielle, tout comme la biochimie, la physiologie et la biologie moléculaire, à la compréhension de mécanismes cellulaires et moléculaires impliqués dans les relations hôtes (plantes ou insectes)-micro-organismes. Dans ce domaine de recherche, l'imagerie cellulaire fournit des résultats qualitatifs et quantitatifs pertinents sur les phénomènes cellulaires associés, aux interactions symbiotiques ou pathogènes. De plus, elle permet d'étudier des phénomènes cellulaires dynamiques et de préciser, dans l'espace et dans le temps, des interactions moléculaires impliquées dans des phénomènes de régulations et dans des processus cellulaires rapides qui découlent du type d'interaction formée entre l'hôte et les micro-organismes étudiés.

Depuis la dernière décade, l'imagerie cellulaire est en constante évolution technologique et méthodologique. D'une part, des équipements commerciaux allient haute sensibilité de détection et haute résolution et d'autre part, des combinaisons d'approches (histo-cytochimie, immunocytologie, hybridation *in situ*...) autorisent une exploration cellulaire pertinente et de plus en plus respectueuse du vivant. Des phénomènes physiologiques et moléculaires sont ainsi identifiés et caractérisés dans leur contexte précis, au niveau tissulaire, cellulaire et aussi sub-cellulaire. Le développement de la microscopie confocale à balayage laser, des fluorochromes (protéines fluorescentes ou sondes chimiques) ainsi que de logiciels de traitement et d'analyse associés permettent des observations descriptives et également les analyses quantitatives (co-localisations, mesures d'intensité de fluorescence, déclin de fluorescence...) et ce, de façon spatio-temporelle. De plus, un continuum est assuré entre cette microscopie confocale classique, dont la limite théorique de résolution est de l'ordre de 150-200 nm et la microscopie électronique dont la résolution est nanométrique. Différentes méthodologies associées à la microscopie électronique permettent une caractérisation fine des événements cellulaires, tant ultrastructurale que moléculaire. La complémentarité des microscopies photonique et électronique offre donc la possibilité d'émettre des hypothèses sur la fonction des molécules suivies et localisées.

Les articles présentés dans ce volume, font appel à des méthodologies variées et sont représentatifs de l'ensemble des techniques. Ils montrent le caractère indispensable de l'imagerie dans la compréhension des phénomènes cellulaires et moléculaires dans les études des interactions hôtes-micro-organismes.

¹ Responsable du Centre de Microscopie INRA/Université de Bourgogne
Plateforme DImaCell (Dispositif Interrégional d'Imagerie Cellulaire)
UMR 1088 PME – Plante Microbe environnement - INRA - F-21065 Dijon Cedex
☎ : 03 80 69 35 43 ✉ jeannine.lherminier@dijon.inra.fr

La fluorescence

Solution pour exploiter les résultats d'expression de gènes bactériens dans une larve d'insecte infestée

¹Sylvie Pagès, Anne Lanois, Nadège Ginibre

Résumé : La bactérie, *Xenorhabdus nematophila* est pathogène pour plusieurs ordres d'insectes. Depuis plusieurs années, l'unité Écologie microbienne des insectes et interactions hôtes pathogènes au centre Inra de Montpellier, étudie les mécanismes moléculaires mis en place par cette bactérie entomopathogène pour tuer l'insecte *Spodoptera littoralis*, ravageur de culture et présent dans le pourtour méditerranéen. Nous savons que *Xenorhabdus* colonise les tissus conjonctifs et se multiplie dans l'hémolymphe entraînant une septicémie mortelle pour l'insecte. Afin de mettre en évidence *in vivo*, l'expression de gènes bactériens au cours de l'infection, l'équipe Génomique et facteurs de virulence a mis en œuvre une technique d'imagerie macroscopique et microscopique de fluorescence. Les observations des différents organes en imagerie de fluorescence ont montré une variabilité et une hétérogénéité de la fluorescence d'une larve à une autre. La quantification de la fluorescence bactérienne mesurée par spectrofluorimétrie et le dénombrement de bactéries dans la chenille entière broyée sont corrélés. De ce fait, les résultats obtenus confirment que cette technique utilisant la fluorescence est adaptée pour l'étude de l'expression des gènes bactériens impliqués dans l'interaction avec l'insecte et peut être transposée à d'autres modèles.

Mots clés : larves d'insectes, bactéries entomopathogènes, *Xenorhabdus*, GFP -Green Fluorescent Protein-, fluorescence.

Introduction

Xenorhabdus nematophila (<http://www.bacterio.cict.fr/xz/xenorhabdus.html>) est une bactérie entomopathogène, symbiotique du nématode *Steinernema carpocapsae* (Némathelminthes ou vers ronds) présent dans les sols. Le couple bactérie nématode est un agent de lutte biologique utilisé en Europe pour lutter efficacement contre les insectes ravageurs de culture. Il est pathogène sur l'insecte *Spodoptera littoralis*, (<http://www.inra.fr/Internet/Produits/HYPPZ/especes.htm>), qui provoque des dégâts aux productions horticoles, légumières dans le Bassin méditerranéen. Au laboratoire, cet insecte est utilisé comme modèle lors des tests de pathologie car c'est celui pour lequel nous avons le plus de données bibliographiques sur le processus infectieux (Sicard *et al.*, 2004). Les tests de pathologie déjà standardisés (Pagès, 2006) sont réalisés en injectant les bactéries avec une seringue. Afin d'étudier la dynamique d'expression *in vivo* de gènes bactériens impliqués dans la virulence, notre équipe a mis au point et a validé *in vivo*, une nouvelle méthodologie de quantification de la fluorescence dans la larve d'insecte entière. Pour cela, nous avons construit chez *Xenorhabdus* une fusion transcriptionnelle entre un promoteur constitutif et le gène rapporteur codant une GFP instable, la GFP-AAV, d'une demi-vie d'une heure. Nous avons effectué une

¹ UMR1133 EMIP - Laboratoire Écologie microbienne des insectes et interactions hôtes pathogènes – INRA
- F-34095 Montpellier ☎ 04 67 14 33 77 ✉ sylvie.pages@supagro.inra.fr

double quantification dans la larve d'insecte entière broyée car *Xenorhabdus* colonise l'hémolymphe et tous les tissus de l'animal au cours du processus infectieux bactérien. Les données acquises sont analysées statistiquement et les résultats positifs ouvrent de nouvelles perspectives d'étude, dans un organisme entier.

1. Matériels, méthodes et résultats

1.1 Construction d'une souche bactérienne produisant de la GFP

La protéine fluorescente verte (*Green Fluorescent Protein*, GFP) a été décrite pour la première fois en 1962 (Shimomura *et al.*, 1962). Elle est issue d'une méduse appelée *Aequorea victoria*. Actuellement, la technique de microscopie de fluorescence utilisant des marqueurs GFP fait partie des méthodes les plus couramment utilisées en imagerie biologique. En effet, la protéine GFP ne nécessite pas d'additifs pour briller, aucune enzyme, juste l'oxygène. Il suffit de la soumettre à une radiation bleue ou UV pour observer une brillance verte. Le chromophore, centre actif de la GFP est responsable de la fluorescence. La molécule fluorescente a la capacité d'adsorber de l'énergie lumineuse dite lumière d'excitation et de la restituer rapidement sous forme de lumière fluorescente ou lumière émise. L'émission de la lumière cesse dès l'arrêt de l'excitation.

Il existe maintenant différentes variantes de la GFP qui émettent de la fluorescence à des longueurs d'ondes (λ) différentes (Cormack *et al.*, 1996). Celle que nous avons utilisée dans cette étude est la GFP-AAV (Andersen *et al.*, 1998) avec un maximum d'excitation à 484 nm et un maximum d'émission à 507 nm. La GFP-AAV est utilisée pour étudier l'expression transitoire des gènes car elle a une demi-vie de 1 heure. La présence en C' terminal d'une séquence d'acides aminés (RPAANDENYAAAV), entraîne la dégradation de la protéine GFP au cours du temps par des protéases bactériennes. Dans notre application, nous avons adapté les longueurs d'onde afin d'éviter le chevauchement des spectres ainsi λ excitation est 485 +/- 4.5 nm et λ émission : 520 +/- 10 nm.

Nous avons construit une fusion transcriptionnelle entre un promoteur constitutif de *Xenorhabdus nematophila* et le gène codant la GFP-AAV dans le plasmide pPROBE'*gfp*[AAV]. Le plasmide ainsi obtenu nommé D31pPROBE'*gfp*[AAV] (**figure 1**) a été transféré par conjugaison chez *Xenorhabdus nematophila* souche F1 (F1D31pPROBE'*gfp*[AAV]). Le promoteur étant constitutif, la GFP est synthétisée tout au long de la phase de croissance de la bactérie et permet la détection des cellules bactériennes fluorescentes sous le microscope à épifluorescence (Leica). Nous avons aussi construit un témoin négatif, *Xenorhabdus nematophila* F1pPROBE'*gfp*[AAV] (PubMed N° accession AF286458) (Miller *et al.*, 2000), contenant le gène codant la GFP-AAV sans promoteur.

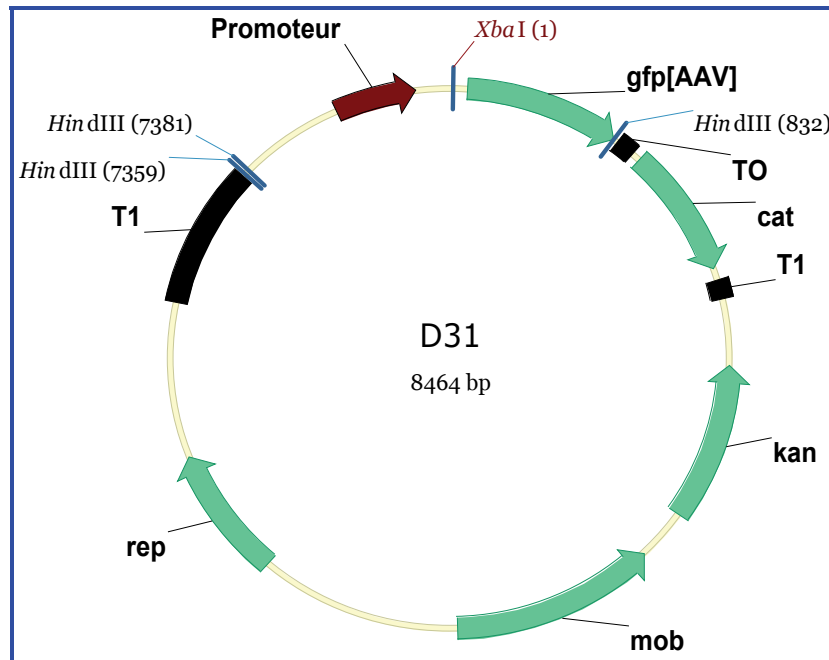
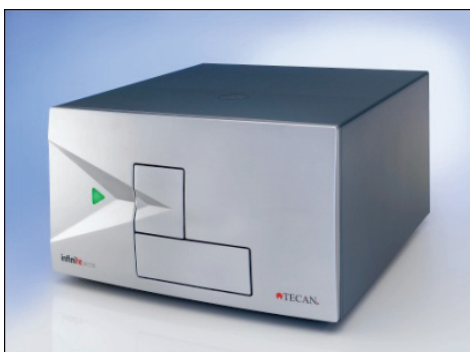


Figure 1 : carte du plasmide AF286458 pPROBE'gfpAAV avec insertion du promoteur constitutif D31

1.2 Contrôle *in vitro* des fusions bactériennes *gfp*[AAV]

Les transconjugants de *Xenorhabdus nematophila* F1 obtenus après conjugaison sont contrôlés avec présence de Kanamycine à 20 µg/ml dans les cultures. Nous avons contrôlé les caractères phénotypiques pour les comparer à ceux de la souche sauvage de *Xenorhabdus nematophila* F1 et prouvé qu'il n'y avait pas de différence liée à l'introduction d'un plasmide. Une cinétique de croissance bactérienne avec mesures simultanées de l'absorbance et de la fluorescence a été réalisée (**figure 2**) à l'aide d'un spectrofluorimètre Infinite M200, (Tecan®, France). Le pilotage s'effectue via le logiciel i-control™ software. Il nous permet de configurer un protocole adapté à notre propre application. Ainsi, les lectures d'absorbance (λ à 600 nm) et de fluorescence (λ excitation 485 +/- 4.5 nm, λ émission : 520 +/- 10 nm) sont mesurées toutes les 30 minutes pendant 25 heures à une température constante programmée à 28°C. La plaque est agitée entre chaque intervalle de lecture pendant 10 mn avec une amplitude de rotation de 3 mm. Pour étudier la cinétique *in vitro*, 200 µl d'une culture bactérienne diluée au 1/500 (LB additionné de Kanamycine à 20 µg/ml) sont déposés dans les puits d'une plaque noire à fond plat transparent à 96 puits de microtitration (Greiner 96 Flat Bottom Black Polystyrol).



Lecteur de microplaques Tecan Infinite 200

<http://www.hellopro.fr/lecteur-de-microplaques-tecan-infinite-200-1001522-54429-produit.html>

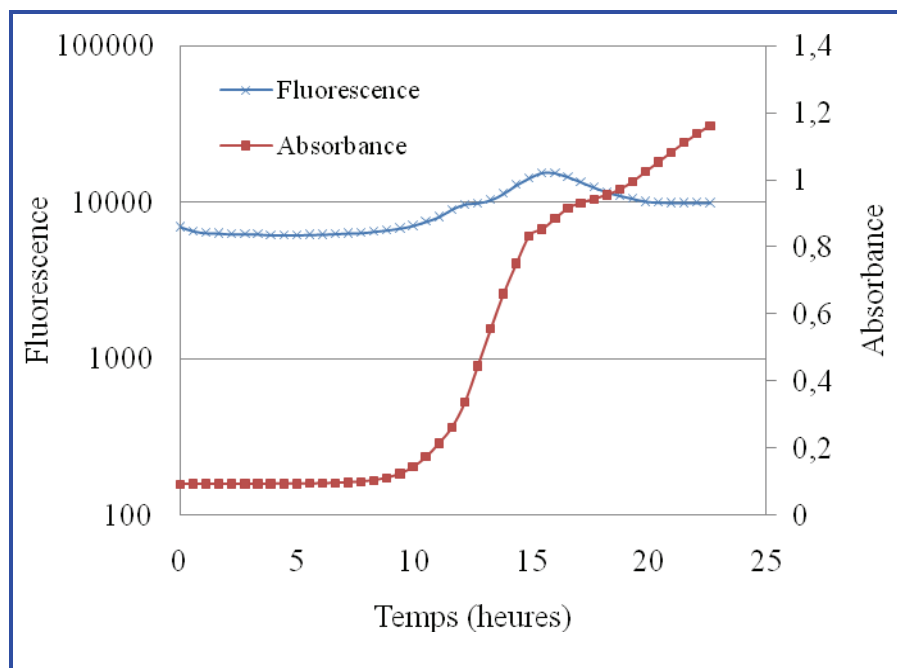


Figure 2 : cinétique de fluorescence et d'absorbance de la culture bactérienne de *Xenorhabdus nematophila* F1D31pPROBE'gfp[AAV] en fonction du temps.

L'augmentation de fluorescence détectée vers 15 heures est due à une accumulation transitoire de fluorescence dans le milieu

1.3 Préparation du matériel biologique

1.3.1 Insectes : les larves de *Spodoptera littoralis* sont triées la veille de l'expérimentation en fin de stade larvaire L5. Le jour de l'injection, seules celles ayant achevé la mue seront utilisées. Le test est ainsi standardisé avec du matériel biologique homogène en terme de développement larvaire au début du stade L6. Les larves sont nourries avec un milieu artificiel mis au point à l'INRA par Poitou *et al* (1970).

1.3.2 Inoculum bactérien : les cultures de F1D31pPROBE'gfp[AAV] et de F1pPROBE'gfp[AAV] sont préparées simultanément. Un bouillon LB additionné de Kanamycine est ensemencé à partir de 2 ou 3 colonies prélevées sur milieu de culture solide, puis mis en agitation (600 rpm) pendant 8 heures à 28°C. 100 µl de la pré-culture servent à ensemencer un nouveau bouillon LB avec Kanamycine qui sera incubée à 28°C pendant une nuit. La culture en phase stationnaire de croissance est lavée dans du tampon PBS sans Ca²⁺ et Mg²⁺ (Gibco) puis centrifugée (5 mn à 13000 tr/mn). Un ml de culture lavée est dilué jusqu'à la dilution de 10⁻³ de façon à injecter dans le corps des larves d'insecte environ 10⁺⁴ bactéries dans un volume de 20 µl.

1.3.3 Micro-injection : deux lots de 40 larves d'insectes sont préparés, l'un pour l'injection de F1D31pPROBE'gfp[AAV] (fusion constitutive) et l'autre pour l'injection de F1pPROBE'gfp[AAV] (témoin négatif). Dans chaque larve, 20 µl de la dilution 10⁻³ sont introduits par l'intermédiaire d'une aiguille Terumo® (0,5 x 16 mm) poussée par le piston d'un micro-injecteur. L'injection se fait entre la 2^{ème} et la 3^{ème} paire de fausses pattes dans la

partie latérale de l'abdomen de la larve. Chaque larve, après injection, est placée individuellement avec un cube de nourriture dans une boîte compartimentée afin d'éviter le cannibalisme.

La boîte contenant les larves est placée dans une enceinte thermostatée à 23°C +/- 1°C, disposant d'un système d'éclairage jour/nuit contrôlant la photopériode L16 :D8 (16 heures de jour et 8 heures de nuit) pendant 20 heures.

1.4 Observation de la fluorescence bactérienne par la technique d'imagerie de fluorescence

Vingt heures après l'injection des bactéries, toutes les larves sont observées au microscope MVX10 à épifluorescence à l'objectif 10 (Plateau MRI DBS à l'Université Montpellier II). Ce microscope est relié à une caméra CCD-CP6-CS à 6.1 MPixels (M42 Optic.fr) et à un logiciel d'acquisition d'images MicroCap3 (Spectrum Software).

On augmente progressivement le temps d'exposition jusqu'à ce que la larve devienne visible, en gardant une marge de sécurité pour éviter de saturer la caméra. Le contrôle de saturation de fluorescence est fait par l'intermédiaire d'un histogramme.

- témoin négatif F1pPROBE'gfp[AAV] : Nous n'observons pas de fluorescence avec un temps d'acquisition de 1 seconde. En revanche, en augmentant le temps d'acquisition au-delà de 1 seconde, on observe une auto-fluorescence.
- fusion constitutive F1D31pPROBE'gfp[AAV] : Grâce au signal fluorescent avec, à la caméra, un temps d'exposition minimum de 10 millisecondes, nous détectons les larves qui ont une infection débutante.

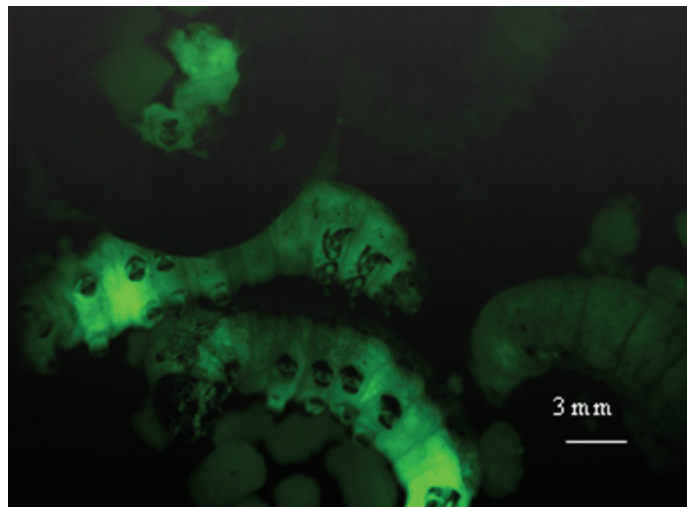


Photo 1 © Inra/Sylvie Pagès : *hétérogénéité de la fluorescence parmi des larves de Spodoptera littoralis infectées par Xenorhabdus nematophila F1D31pPROBE'gfp[AAV] au début de l'infection bactérienne (macroscopie à épifluorescence)*

À un temps précoce après l'injection, c'est-à-dire vers 20 heures après l'injection, dans un lot de larves, l'intensité de la fluorescence est hétérogène pour une même dose de bactéries injectées au départ. Grâce à la sensibilité de la caméra, nous observons et nous localisons des zones fluorescentes de diamètre plus ou moins grands au travers de la cuticule au niveau de l'abdomen à un temps d'exposition d'une seconde (**photo 1**). Puis, plus tard vers 22 heures après l'injection, nous obtenons un signal fluorescent suffisant même en diminuant le temps d'exposition à 10 millisecondes. La fluorescence s'intensifie et elle est beaucoup plus

homogène dans tout le corps de la larve d'insecte. En effet, l'ensemble des organes de la larve d'insecte baigne dans l'hémolymphe² qui remplit la totalité du corps de la chenille. Les bactéries, après avoir colonisées le tube digestif se multiplient et envahissent l'hémolymphe. À ce moment là, si nous prélevons une goutte d'hémolymphe à partir d'une larve présentant une fluorescence homogène, alors nous observons au microscope à épifluorescence la présence de bactéries circulantes fluorescentes. Nous continuons l'observation en effectuant une dissection dorsale de la larve d'insecte. L'épiderme est incisé depuis la capsule céphalique (tête) jusqu'à l'anus. Nous observons le tube digestif qui est le principal organe remplissant presque toute la cavité de l'insecte. En fonction du degré d'infection de la larve, nous observons soit des micro-colonies bactériennes (**photo 2**) qui se développent au niveau du tube digestif antérieur, soit les bactéries fluorescentes sont plus nombreuses et sont présentes le long des trachées (**photo 3**).

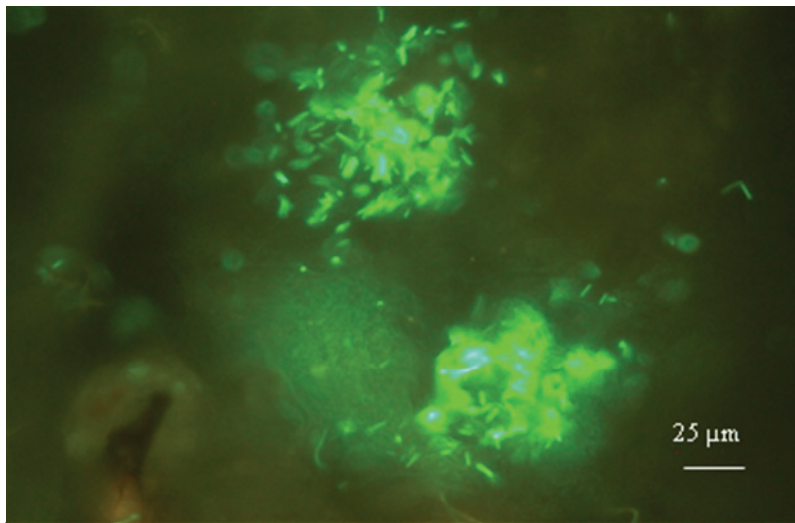


Photo 2 ©Inra/Sylvie Pagès : *observation de micro-colonies bactériennes prélevées dans l'épithélium digestif d'une larve de Spodoptera littoralis (microscopie à épifluorescence)*

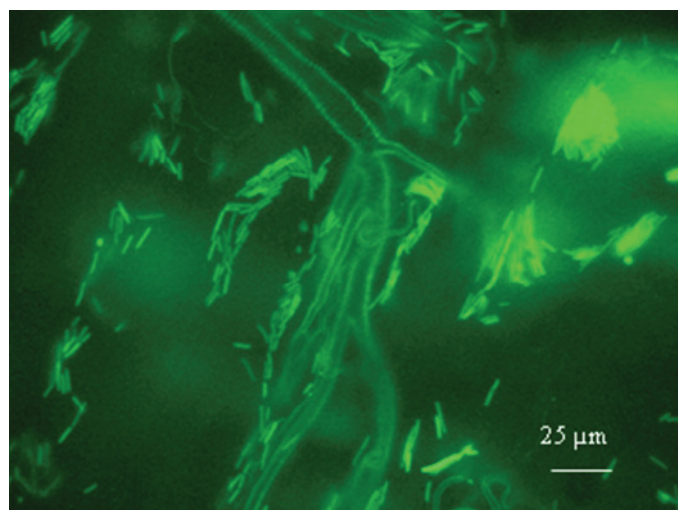


Photo 3 © Inra/Sylvie Pagès : *invasion des bactéries par les trachées (microscopie à épifluorescence)*

² Hémolymphe : équivalent du sang humain chez les insectes.

1.5 Quantification de la fluorescence

1.5.1 Broyage des larves

Pour quantifier la fluorescence des bactéries, nous sommes obligés de broyer la larve entière. En effet, les bactéries ne sont pas exclusivement présentes dans l'hémolymphe mais présentes dans tous les tissus. Pour le broyage, nous utilisons un homogénéiseur, disperseur Ultra-Turrax T10 (Terumo®). Avant de broyer l'animal, la capsule céphalique de la chenille est enlevée ensuite, il faut :

- placer la chenille au dessus d'un tube eppendorf pour récupérer l'hémolymphe qui peut s'en échapper ;
- découper la cuticule, à l'aide de ciseau dans la partie longitudinale de la larve ;
- évacuer la larve de son contenu dans le tube eppendorf de 2 ml ; un volume de 500 µl est récupéré contenant l'hémolymphe, le tube digestif, le corps gras et tous les autres organes de la larve d'insecte ;
- ajouter 1 ml de milieu liquide LB dans le tube de 1,5 ml (Eppendorf®, France) ;
- vortexer l'échantillon pendant 1 minute.

Avec l'homogénéiseur, les tissus sont broyés pendant une minute à vitesse maximale. Par la haute vitesse du rotor, le fluide à travailler est aspiré automatiquement dans le sens axial dans la tête de dispersion et comprimé ensuite dans le sens radial à travers les fentes du système rotor/stator. Le matériel est ainsi soumis à de très hautes forces de cisaillement et de poussée. Dans l'interstice entre le rotor et le stator, il se forme en plus une haute turbulence donnant lieu à un mélange optimal de la suspension.

1.5.2 Préparation de l'échantillon broyé

Par centrifugation à 2000 tr/mn pendant 2 mn, les débris cellulaires tombent physiquement au fond du tube de 1.5 ML. Un volume de 100 µl du surnageant de l'échantillon est déposé dans le puits d'une plaque noire à fond plat transparent à 96 puits de microtitration (Greiner® 96 Flat Bottom Black Polystyrol).

1.5.3 Mesure de l'expression de la protéine fluorescente *gfp*[AAV]


La fluorescence de chaque échantillon est mesurée au spectrofluorimètre M200 Infinite, à λ excitation 485 +/- 4.5 nm et à λ émission 520 +/- 10 nm. Les résultats sont automatiquement transférés dans un fichier Excel.

1.5.4 Dénombrement des cellules bactériennes

L'échantillon broyé est dilué de 10 en 10 en PBS jusqu'à une dilution 10^{-3} . Nous dénombrons dans la cellule hématimètre de Thoma (Preciss®) toutes les cellules bactériennes fluorescentes à partir des dilutions 10^{-2} ou 10^{-3} . La cellule hématimètre, d'un volume de 1 mm³, d'une profondeur de 0.1 mm, est formée de 16 grands carrés composés chacun de 16 petits carrés. Elle permet de dénombrer tous les éléments visibles. Le dénombrement est réalisé à l'objectif 40. Toutes les cellules bactériennes situées à l'intérieur des lignes délimitant cette surface sont comptées hormis celles situées sur la ligne de gauche et celles situées sur la ligne du haut.

1.6 Résultat principal et interprétation

La relation entre l'intensité de la fluorescence et le nombre de cellules bactéries par insecte est illustrée dans la **figure 3**. Cette figure montre que la relation obtenue entre ces 2 paramètres est linéaire ($R^2 = 0.7627$). Nous pouvons dire que, plus la valeur de la fluorescence est élevée plus l'infection bactérienne dans la larve d'insecte augmente.

Malgré ce résultat déjà encourageant, une analyse statistique était nécessaire pour valider la méthode. Elle a été réalisée à partir des mêmes données d'expression de la fusion transcriptionnelle constitutive F1D31pPROBE'gfp[AAV]. Nous avons utilisé un logiciel de statistique  (<http://www.r-project.org/>) pour générer un modèle linéaire généralisé (GLM) en utilisant un test de Durbin-Watson (Ferdy J B, communication personnelle). L'analyse statistique valide notre méthode de quantification de l'expression d'un gène bactérien au cours de l'infection bactérienne. Ce résultat de proportionnalité rend compte aussi de l'activité constante du promoteur constitutif de *Xenorhabdus nematophila* souche F1.

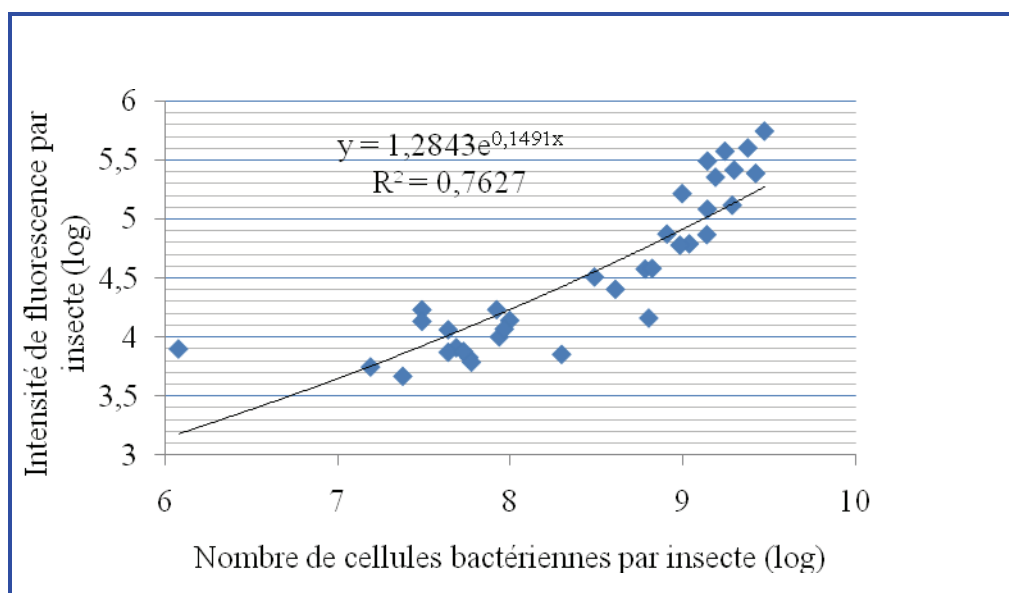


Figure 3 : relation entre l'intensité de la fluorescence et le nombre de cellules bactériennes contenues dans une larve d'insecte

Conclusions et Perspectives

Grâce à l'utilisation de la fluorescence, par l'intermédiaire d'une fusion bactérienne transcriptionnelle entre un promoteur constitutif de *Xenorhabdus nematophila* et le gène de la GFP-AAV, nous avons localisé les sites infectés dans l'insecte et quantifié la fluorescence au cours de l'infection. Nous avons validé statistiquement notre protocole car la quantité de fluorescence émise par la fusion transcriptionnelle constitutive GFP-AAV est proportionnelle à la quantité de bactéries dans la larve entière au cours de l'infection. Parmi toutes les GFP existantes, la GFP-AAV instable est adaptée au suivi *in vivo* d'une expression transitoire d'un gène bactérien, car sa demi-vie de fluorescence est d'une heure. Nous avons remarqué qu'en début d'infection, les résultats de fluorescence sont hétérogènes et contraignent l'expérimentateur à observer plusieurs larves. Au-delà du stade précoce de l'infection, les

données quantitatives de fluorescence montrent une activité constante du promoteur constitutif. Parmi les nouvelles perspectives d'étude au laboratoire, de nouvelles fusions transcriptionnelles entre des promoteurs de gènes potentiellement impliqués dans la virulence et la GFP-AAV seront construites. Des doubles fusions pourront être envisagées pour suivre simultanément, *in vivo*, l'expression de plusieurs gènes. Cette méthode associant des techniques d'imagerie et de quantification de la fluorescence par spectrofluorimétrie peut être transposée sur un autre modèle où l'animal d'étude est une larve d'insecte de petite taille.

Bibliographie

- Andersen J.B., Sternberg C., Poulsen L.K., Bjørn S.P., Givskov M., and Molin S. (1998) New unstable variants of green fluorescent protein for studies of transient gene expression in bacteria. *Applied and Environmental Microbiology*, (64): 2240-2246
- Cormack BP., Valdivia RH., Falkow S. (1996) FACS-optimized mutants of the green fluorescent protein (GFP) *Gene*, (173): 33-38
- Miller WG., Leveau JH., Lindow SE. (2000) Improved *gfp* and *inaZ* broad-host-range promoter-probe vectors. *Mol Plant Microbe Interact*, (13): 1243-50
- Pagès S., Ginibre N. (2006) Évaluation de la virulence de bactéries entomopathogènes. Mise en place au laboratoire d'un bio essai reproductible en conditions contrôlées. *Cah.Tech.INRA*, (57) :11-19
- Poitout S., Bues R. (1970) Élevage de plusieurs espèces de lépidoptères *noctuidae* sur milieu artificiel riche et sur milieu artificiel simplifié. *Annales de Zoologie Ecologie animale*, (2) : 79-91
- Shimomura O., Johnson F.H., Saiga Y. (1962) Extraction, purification and properties of *aequorin*, a bioluminescent protein from the luminous hydromedusan, *Aequorea*. *J. Cell. Comp. Physiol*, (59): 223-240
- Sicard M., Brugirard-Ricaud K., Pagès S., Lanois A., Boemare N., Brehélin M., Givaudan A. (2004) Stages of infection during the tripartite interaction between *Xenorhabdus nematophila*, its nematode vector, and insects hosts. *Applied and Environmental Microbiology*, (70): 6473-6480

Références

- <http://www.bacterio.cict.fr/xz/xenorhabdus.html> (consulté le 25/11/2010)
- <http://www.inra.fr/Internet/ Produits/ HYPPZ/especes.htm> (consulté le 25/11/2010)
- <http://www.r-project.org/> (consulté le 25/11/2010)
- <http://www.hellopro.fr/lecteur-de-microplaques-tecan-infinite-200-1001522-54429-produit.html> (consulté le 8/12/2010)

Localisation et visualisation de transcrits fongiques *in situ*

Une méthode originale qui combine biologie moléculaire et microscopie confocale

¹Christine Arnould, Marie Tollot, Pascale Seddas, Vivienne Gianinazzi-Pearson

Résumé : *Les Glomérormycètes, formant la symbiose mycorhizienne à arbuscules, sont des champignons biotrophes obligatoires qui sont intimement associés aux tissus végétaux qu'ils colonisent. Les techniques utilisées pour suivre l'expression des gènes fongiques dans les racines mycorhizées ne permettent pas de définir le profil spatio-temporel de leur activité. Afin de tracer l'activité transcriptionnelle fongique dans les racines mycorhizées, une méthode innovante, basée sur la RT-PCR in situ, a donc été développée. Cette technique permet de localiser, en microscopie optique confocale à balayage laser, des transcrits fongiques, à l'aide d'amorces spécifiques marquées par un fluorochrome. Du fait de leur importance biologique et de la facilité de leur détection, nous avons choisi les gènes ribosomiaux du champignon *Glomus intraradices* pour mettre au point la méthode dans son intégralité. Nous avons ensuite étendu avec succès cette méthode à d'autres gènes fongiques incluant certains gènes dont le niveau d'expression est faible. Cette technique ouvre la possibilité de mieux comprendre les interactions existant entre les champignons, symbiotiques ou pathogènes, et leurs partenaires végétaux.*

Mots clés : RT-PCR *in situ*, microscopie optique confocale, expression de gène, champignon, mycorhize

Introduction

Les Glomérormycètes sont des champignons symbiotiques qui s'associent aux racines d'environ 80 % des plantes terrestres pour former des structures particulières appelées mycorhizes à arbuscules. Cette association assure aux plantes un apport d'éléments nutritifs par le champignon tels que le phosphore (P), l'azote (N), l'eau et les oligo éléments, mais aussi une croissance améliorée et une bioprotection des racines vis-à-vis des agents pathogènes (Smith et Gianinazzi-Pearson, 1988).

Les Glomérormycètes étant des symbiotes obligatoires, c'est-à-dire non cultivables sans une plante, actuellement, il n'existe pas de système de transformation stable pour ces champignons. Ceci explique que les gènes fongiques, impliqués dans les mécanismes moléculaires de la mise en place puis du fonctionnement de la symbiose, sont encore mal connus. Leur étude au niveau moléculaire et cellulaire reste donc un défi.

Si les méthodes classiques de biologie moléculaire telles que la RT-PCR (Reverse Transcriptase-Polymerase Chain Reaction) en gel ou quantitative (qPCR), ou les analyses *in silico* (comparaison de séquences) offrent la possibilité de mettre en évidence des gènes impliqués dans la symbiose, elles s'adressent majoritairement aux gènes de plantes. Elles ne renseignent donc pas sur la localisation tissulaire ou cellulaire des transcrits fongiques.

¹ INRA- UMR Plante Microbe Environnement, F-20065 Dijon cedex

☎ 03 80 69 35 57 ✉ christine.arnould@dijon.inra.fr

Tous ces éléments ont conduit notre équipe de cytologie moléculaire de l'unité Plante, Microbe, Environnement du centre Inra de Dijon, à mettre au point une méthode originale, rapide et précise, afin de relier l'expression des gènes fongiques aux structures formées par les Gloméromycètes lors du développement de la symbiose mycorhizienne.

Pour cela, nous avons combiné les techniques de biologie moléculaire avec l'utilisation de la microscopie confocale pour visualiser et localiser de façon précise l'expression des gènes étudiés. Cette méthodologie innovante présente deux avantages majeurs : le premier est de visualiser des transcrits fongiques *in situ*, en microscopie confocale, grâce à l'utilisation d'amorces spécifiques d'un gène d'intérêt, marquées par un fluorochrome ; le deuxième est de pouvoir analyser l'expression de gènes fongiques à différents stades de la symbiose (Seddas *et al.*, 2008). En effet, la microscopie confocale donne accès à des informations émanant de différents tissus en profondeur dans l'échantillon et, grâce au Contraste Interférentiel Différentiel, permet de préciser la localisation cellulaire du fluorochrome.

Dans un premier temps, nous avons mis au point les modalités techniques de la méthode en étudiant la localisation des transcrits de la grande sous unité ribosomique (GSU 28S), abondamment présents dans les cellules. Puis, nous nous sommes focalisés sur l'expression de quatre gènes codant pour différentes protéines fongiques : PEPISOM (peptidyl propyl isomérase) intervenant dans le métabolisme des protéines ; DESAT (stéaroyl CoA désaturase) impliquée dans le métabolisme des lipides ; SOD (Cu/Zn superoxyde dismutase) associée aux réactions au stress ; et STE12, facteur de transcription. Les transcrits ont été étudiés dans les différentes étapes du cycle biologique du *Glomus intraradices*, à partir des spores jusqu'à la colonisation des racines de *Medicago truncatula*. La technique de RT-PCR *in situ* que nous avons développée est décrite en détail par Seddas *et al.*, (2008, 2010). Les résultats présentés dans cet article concernent les gènes *DESAT* et *STE12* de *G. intraradices*.

1. Matériels biologiques

1.1 *Medicago truncatula* Gaertn (figure 1) est une plante modèle choisie pour étudier les interactions entre plantes et micro-organismes. Son génome de 450Mb est largement séquencé. C'est une légumineuse qui forme des associations symbiotiques aussi bien avec des bactéries du sol (rhizobia), en formant des nodules racinaires, qu'avec des champignons symbiotiques pour établir la mycorhize à arbuscules.

Les graines (fournies par G. Duc, Inra-Dijon) sont mises à germer puis cultivées en présence ou non du champignon *G. intraradices* dans les conditions décrites par Weidmann *et al.* (2004). Les plantes sont prélevées après trois semaines de culture et les racines lavées à l'eau osmosée à 4°C.



Figure 1 : *Medicago truncatula*

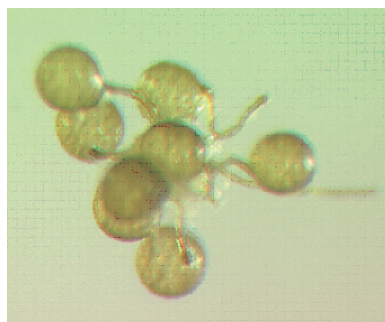


Figure 2 : *Glomus intraradices*

1.2 *Glomus intraradices* est un champignon symbiotique qui appartient à la famille des Gloméromycètes. Dans le sol et les racines, il forme des spores d'un diamètre de 80-100µm (**figure 2**). Sous influence des racines, il développe différentes structures qui interviennent dans la mise en place de la symbiose : hyphes de germination, appressoria, hyphes intercellulaires, vésicules et arbuscules (**figure 3**). Le génome de *G. intraradices* DAOM 197198 (Premier Tech Ltd, Canada) est en cours de séquençage. Les spores de *G. intraradices* sont mises à germer selon la méthode de Seddas *et al.* (2009). Les spores sont prélevées au bout de 7 jours de germination

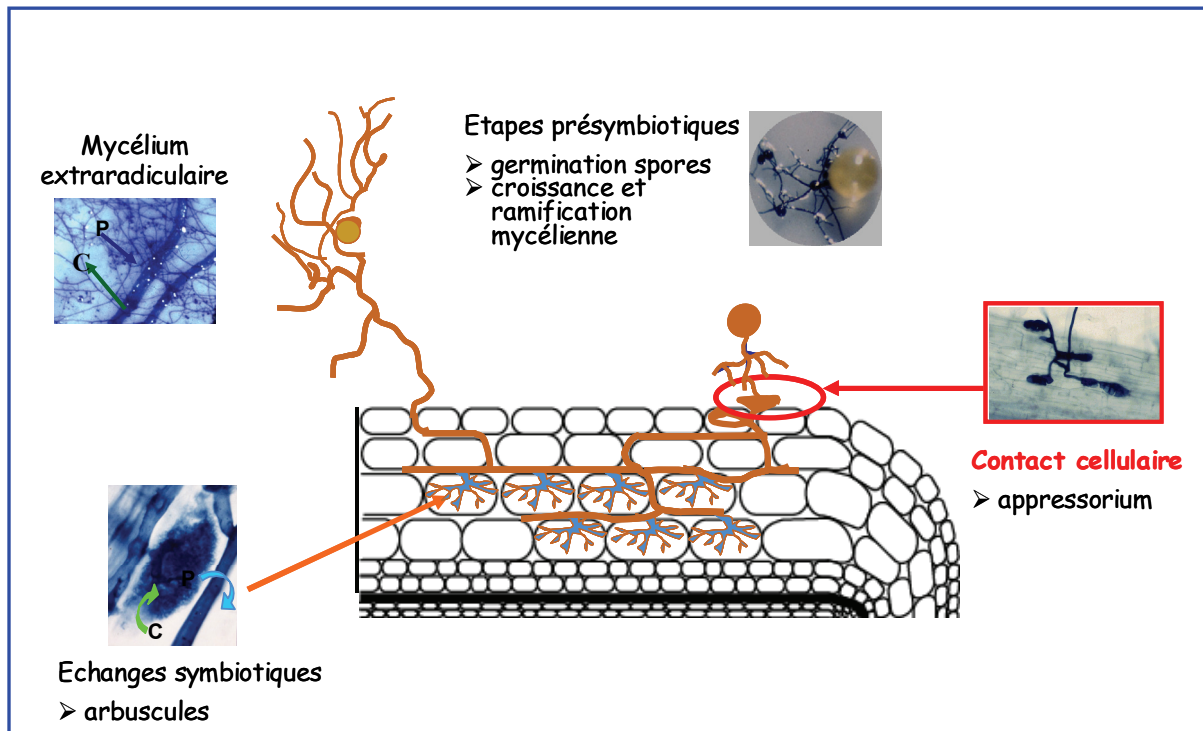


Figure 3 : Cycle biologique d'un champignon mycorrhizogène à arbuscules (d'après V. Gianinazzi-Pearson)

2. Choix des gènes fongiques et d'amorces pour PCR

Les gènes ribosomiaux de la grande sous-unité ont été choisis pour la mise au point de la méthode du fait de l'abondance de leur transcrits au niveau cellulaire et de la disponibilité des séquences pour les amorces spécifiques (Tuinen *et al.*, 1998). Ils serviront ensuite de contrôle positif dans toutes les expériences et pour chaque gène étudié. Les amorces pour le gène *DESAT* (Seddas *et al.*, 2008), ont été obtenues à partir de séquences dans la banque de données MENS (Journet *et al.*, 2002) et celles du *STE12* ont été déduites à partir de séquences homologues dans d'autres champignons (Tollot *et al.*, 2009). La spécificité des amorces a été vérifiée par séquençage des produits de PCR sur l'ADNc de spores de *G. intraradices*, et par le manque d'amplification sur des ADNc de racines de *M. truncatula* non inoculées. Les amorces choisies amplifient des séquences de 200-659 pb.

3. RT-PCR *in situ*

Le protocole développé est résumé dans la **figure 4**

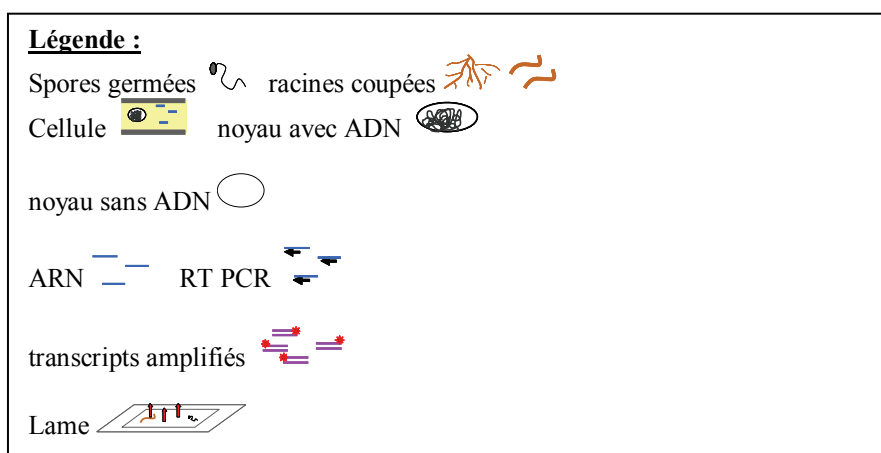
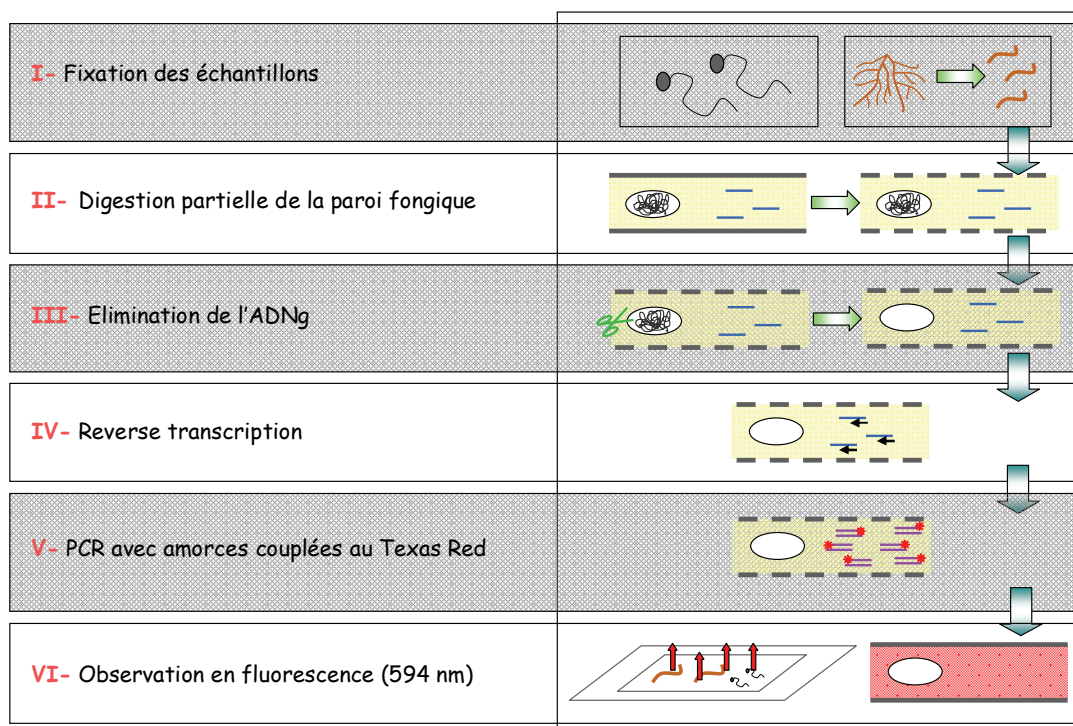


Figure 4 : récapitulatif de la méthode de RT-PCR *in situ* (d'après M.Tollot).

3.1 Préparation des échantillons et choix des fluorochromes

Les spores germées (environ 200) ou les racines découpées sur de la glace en fragments de quelques mm sont fixées par une solution contenant : 2V éthanol 100 %, 1V acide acétique glacial et 10 % de DMSO (diméthyl sulfoxyde). Les échantillons sont placés à 4°C, la nuit, sous agitation rotative.

Préalablement à la RT-PCR, les parois fongiques et végétales sont perméabilisées afin de permettre la pénétration des réactifs en utilisant respectivement la chitinase (de *Streptomyces griseus*) (Référence C6137 SIGMA) et la pectinase (d'*Aspergillus niger*) (Référence 17389 FLUKA). Puis, les protéines sont digérées par la protéinase K (Référence V3021 PROMEGA).

Enfin, l'ADN génomique est coupé en petit brins par des enzymes de restriction HaeIII (Référence R6171 PROMEGA) et HpaII (Référence R6311 PROMEGA), et éliminé par une incubation dans une ADNase (DNase 1 Référence 79254 QIAGEN) durant 5 heures à 37°C. Toutes ces étapes sont effectuées en présence d'un inhibiteur d'ARNase (RNAsin Ribonucléase inhibiteur Référence N 2111PROMEGA).

Les fluorochromes doivent être choisis de façon à éviter de recueillir leur émission de fluorescence aux longueurs d'ondes révélant l'autofluorescence des tissus racinaires et des spores. La réalisation d'un spectre d'émission pour des racines témoins non inoculées de *M. truncatula* et pour les spores germées de *G. intraradices* a permis de définir une raie d'excitation (594 nm) et une bande d'émission du signal recueilli (606-640 nm). En conséquence, les amorces choisies précédemment seront marquées par le fluorochrome Texas Red en position 5'.

3.2 Synthèse d'ADNc, amplification par PCR et montage des lames

La transcription reverse d'ARN en ADNc est effectuée sur les échantillons de racines et de spores en présence de l'inhibiteur d'ARNase selon le protocole décrit par Seddas *et al.* (2008). Afin de contrôler la spécificité de la réaction, une digestion avec 100U de RNase est effectuée à cette étape sur une partie des échantillons. Les ADNc sont ensuite amplifiés par PCR en utilisant un programme spécifique pour chaque gène (Seddas *et al.*, 2008, Tollot *et al.*, 2009). Par exemple, pour le gène de la grande sous unité ribosomique, il s'agit de :

1. étape de dénaturation à la température de 95°C 1 minute,
2. étape d'hybridation des amorces à la température de 55°C 1 minute,
3. étape d'élongation à la température de 72° C 2 minutes,
4. retour à la ligne 1 pour 29 cycles,
5. étape d'élongation finale à la température de 72°C 2 minutes.

Un contrôle négatif est réalisé pour chaque ADNc sur une partie des échantillons en omettant les amorces d'amplification. Les échantillons sont post-fixés dans l'éthanol 100 % puis transférés dans un gradient décroissant d'éthanol avant d'être lavés à l'eau Ultra pure.

Des fragments de racines ou des spores germés sont déposés sur des lames en verre préalablement induites d'une solution retardant le photo-blanchiment (Ref S3023 DAKO) et recouverts d'une lamelle. Chaque lame est déposée sur un support à plat, à l'abri de la lumière, à 4°C avant d'être observée au microscope confocal à balayage laser SP2 Leica.

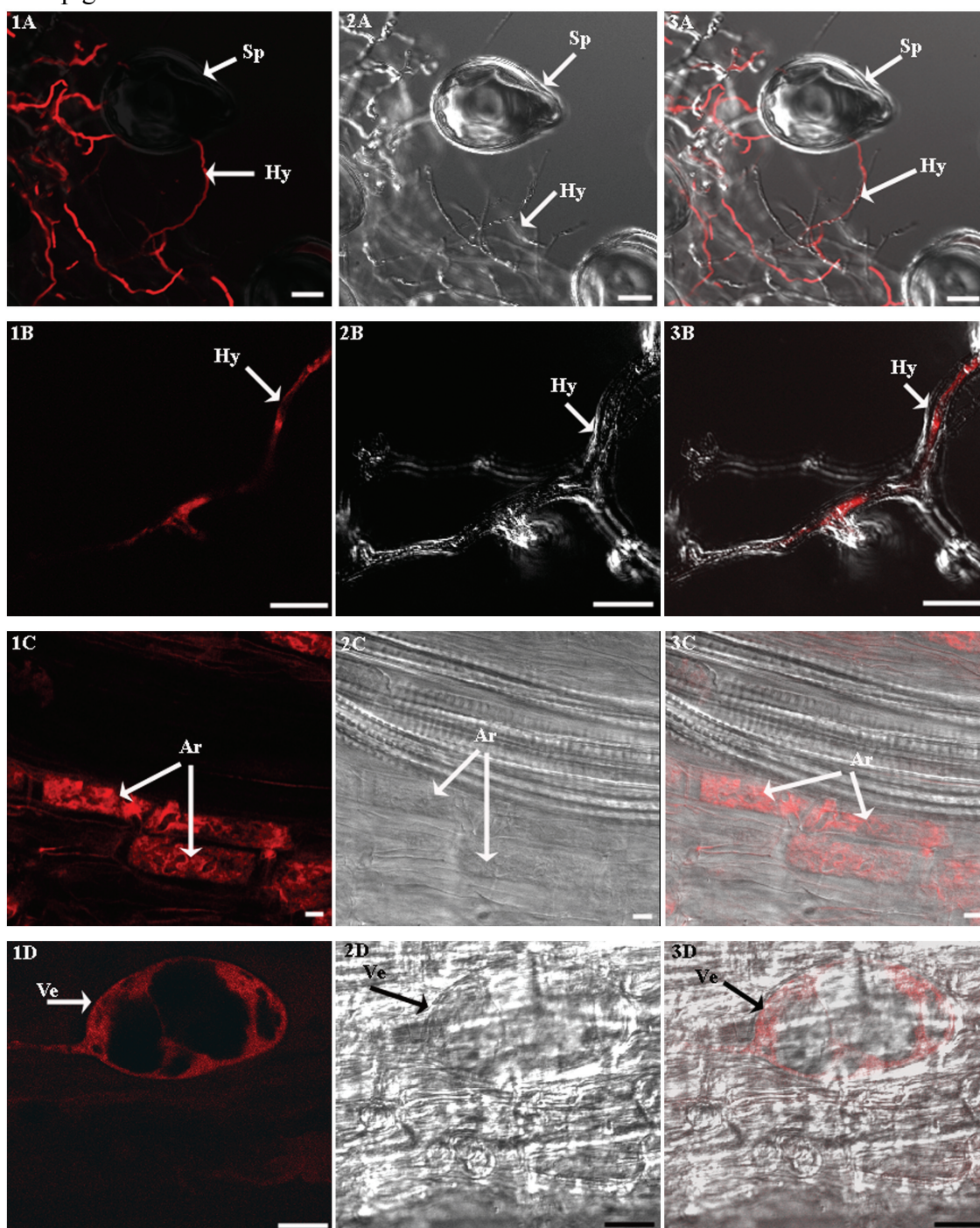
4. Résultats

L'observation du contrôle positif indique que la détection de l'expression des gènes fongiques ribosomiaux est constante et forte quel que soit le stade du développement du *G. intraradices* (résultats non montrés).

Les transcrits du gène *DESAT* (**figure 5A**) ne sont que faiblement présents dans les spores (Seddas *et al.* 2008). En revanche, l'expression de ce gène augmente dans les hyphes provenant de la germination des spores (**figure 5A**), et les transcrits sont clairement détectés au niveau des différentes structures fongiques formées en association avec la racine : hyphes externes (**figures 5B**), appressoria, arbuscules (**figure 5C**) et vésicules (**figure 5D**).

La dynamique de l'expression du gène *STE12* diffère au niveau des structures fongiques. En effet, ce gène est exprimé dans les spores (**figure 6A, 6B**) et dans les appressoria (**figure 6C, D**), mais aucune structure fongique dans les racines n'est révélée par la RT-PCR *in situ*.

Ces résultats mettent en évidence une expression différentielle des gènes de *G. intraradices*, suggérant une spécialisation de l'activité des tissus fongiques selon le stade du cycle biologique du champignon.



Figures 5 : localisation des transcrits du gène *DESAT* de *Glomus intraradices* dans les hyphes issus de spores germées (A), et dans le mycelium externe (B), les arbuscules (C) et les vésicules (D) intraradiculaires lors de la mycorhization de *Medicago truncatula* (14 jours post inoculation). Les observations sont présentées en images de microscopie (1) confocale, (2) Contraste Interférentiel Différentiel, et (3) confocale combinée avec le Contraste Interférentiel Différentiel.

Barre : 20µm, Sp spore, Hy hyphe, Ar arbuscule, Ve vésicule

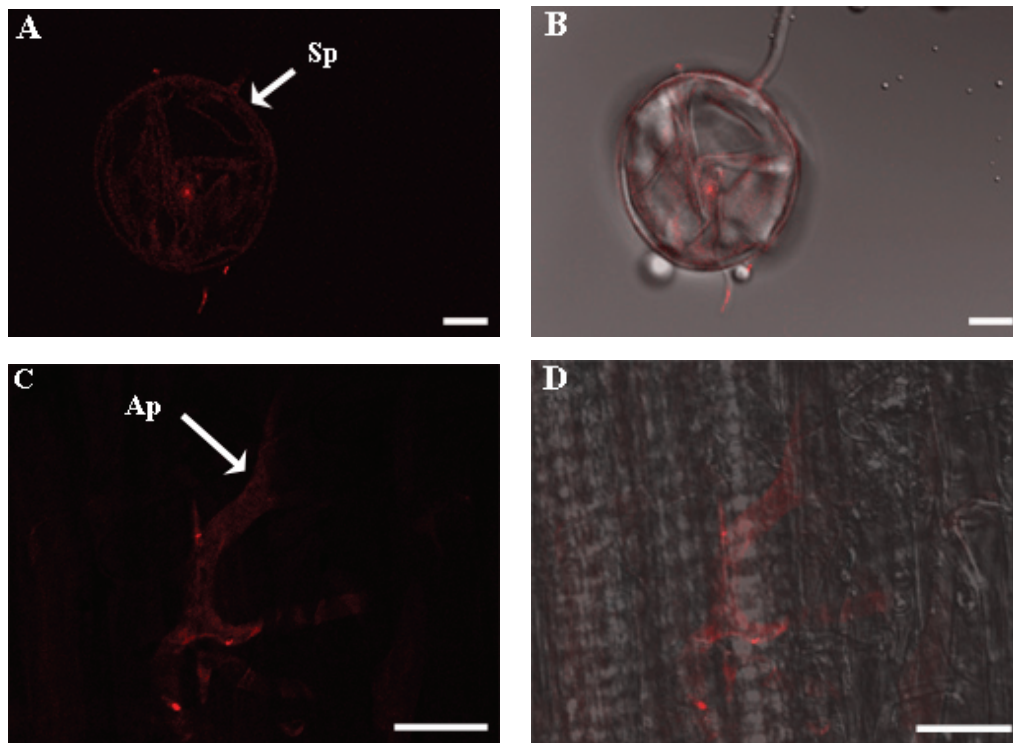


Figure 6 : localisation des transcrits du gène *STE12* de *Glomus intraradices* dans les spores germées (A, B) et dans le mycélium externe développant un appressorium (C, D) lors de la mycorhization de *Medicago truncatula* (14 jours post inoculation). Les observations sont présentées en images de microscopie confocale, (A, C) et confocale combinée avec le Contraste Interférentiel Différentiel (B, D).

Barre : 20 μ m, Sp spore, Ap appressorium

Conclusion

Pour la première fois et grâce à l'originalité de la RT-PCR *in situ* utilisant des amorces de PCR marquées par un fluorochrome, nous avons pu au sein de notre équipe relier l'expression de gènes fongiques aux structures morphologiques formées lors des interactions avec les tissus d'une plante-hôte. Ainsi, nous avons visualisé les transcrits de différents gènes fongiques à différentes étapes de la symbiose mycorhizienne à arbuscules. L'activation du gène *DESAT* au niveau de l'ensemble des structures fongiques identifiées dans les racines et la mise en évidence d'une activation spécifique du gène *STE12* uniquement lors des étapes précoces de l'interaction, sont en accord avec ceux obtenus par qPCR (Seddas *et al.*, 2009, Tollot *et al.*, 2009). La technique a aussi été appliquée avec pertinence aux interactions avec les plantes déficientes pour la mycorhization (Seddas *et al.*, 2010). Les résultats que nous avons obtenus grâce à cette technique complètent les connaissances actuelles sur les gènes fongiques exprimés au niveau des interactions symbiotiques entre les deux partenaires. La RT PCR *in situ* est également un outil qui, dans la perspective d'exploiter les données du séquençage de *G. intraradices*, pourrait apporter de précieuses informations complémentaires sur les mécanismes impliqués dans la symbiose mycorhizienne.

Grâce à sa grande sensibilité, la RT PCR *in situ* très bien adaptée à des études de gènes faiblement exprimés. Il serait intéressant d'étendre cette méthodologie à l'étude d'autres interactions notamment entre plantes et champignons pathogènes.

Remerciements : Les auteurs remercient Philippe Aubert, Valérie Monfort et Annie Colombet de l'entretien des installations et des chambres de cultures.

Bibliographie

- Seddas P., Arnould C., Tollot M., Gianinazzi-Pearson V. (2008) Spatial monitoring of gene activity in extraradical and intraradical developmental stages of arbuscular mycorrhizal fungi by direct fluorescent *in situ* RT-PCR. *Fungal Genet. Biol.*, 45, 1155-1165.
- Seddas P., Arnould C., Arias C., Godfroy O., Ait Ben Hassou H., van Tuinen D., Morandi D., Gianinazzi-Pearson V. (2009) Inactivation of symbiosis-related plant genes alters gene responses in an arbuscular mycorrhizal fungus. *Mol. Plant-Microbe Interact.*, 22, 341-351.
- Seddas-Dozolme P.M.A., Arnould C., Tollot M., Kuznetsova E., Gianinazzi-Pearson V. (2010) Spatial monitoring of arbuscular fungal gene activity by direct fluorescent *in situ* RT - PCR. In: Sharon A (Ed), *Molecular and Cell Biology Methods for Fungi*, Humana Press, Springer, Berlin - Heidelberg, 137-152.
- Smith, S., Gianinazzi-Pearson, V. (1988) Physiological interactions between symbionts in vesicular-arbuscular mycorrhizal plants. *Ann. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.*, 39, 221-224.
- Tollot M., van Tuinen D., Arnould C., Chatagnier O., Wong Sak Hoi. J., Dumas B., Gianinazzi-Pearson V., Seddas P. (2009) An STE12 gene identified in the mycorrhizal fungus *Glomus intraradices* restores infectivity of a hemibiotrophic plant pathogen. *New Phytol.*, 181, 693-707.
- van Tuinen D., Jacquot E., Zhao B., Gollotte A., Gianinazzi-Pearson V. (1998) Characterization of root colonization profiles by a microcosm community of arbuscular mycorrhizal fungi using 25S rDNA-targeted nested PCR. *Mol. Ecol.*, 7, 879-887.
- Weidmann S., Sanchez L., Descombin J., Chatagnier O., Gianinazzi S., Gianinazzi-Pearson V. (2004) Fungal elicitation of signal transduction-related plant genes precedes mycorrhiza establishment and requires the *dmi3* gene in *Medicago truncatula*. *Mol. Plant-Microbe Interact.*, 17, 1385-1393.

Évaluation de la fluidité de la membrane plasmique avec la sonde fluorescente di-4-ANEPPDHQ

Adaptation de la technique de recouvrement de fluorescence
après photoblanchiment (FRAP) sur cellules végétales en suspension

Christophe Der¹

Résumé : Au cours de l'interaction entre plantes et microorganismes, la membrane plasmique joue un rôle essentiel dans l'organisation précoce des mécanismes de réactions de défense mises en place par la plante. L'équipe *Dynamique membranaire et réponse aux stress biotiques*, de l'UMR *Plante-Microbe-Environnement*, s'intéresse aux modifications des propriétés du plasmalemmes des cellules végétales dans ce type d'interactions. La fluidité membranaire est une de ces propriétés. La technique de retour de fluorescence après photoblanchiment (FRAP), réalisée à l'aide d'un microscope confocal à balayage laser, a été adaptée à l'étude des variations de la fluidité de la membrane plasmique de cellules BY-2 de tabac en suspension, marquées par une sonde fluorescente, la di-4-ANEPPDHQ, s'insérant dans un des feuillettes de la membrane plasmique. Nous proposons ici un protocole optimisé d'acquisition et d'analyse des données issues de cette méthodologie FRAP.

Mots-clés : FRAP, fluidité membranaire, cellules BY-2, membrane plasmique, di-4-ANEPPDHQ

Introduction

La diminution de l'utilisation des intrants et le développement de nouvelles méthodes culturales plus respectueuses de l'environnement passent par une meilleure connaissance des mécanismes de réactions de défense développés par les plantes quand elles sont attaquées par des agents pathogènes.

Au cours de ces interactions entre plantes et microorganismes, la membrane plasmique est l'un des principaux acteurs de la mise en place des étapes précoces de réactions de défense de la plante entière. En effet, cette membrane ne constitue pas seulement une frontière entre le milieu extracellulaire et intracellulaire, elle joue aussi un rôle crucial dans la détection des modifications environnementales et dans la transmission de l'information intracellulaire. Des molécules de microorganismes peuvent être ainsi reconnues au niveau du plasmalemmes de l'hôte et déclencher toute une série de réactions, permettant la mise en place d'une résistance des plantes vis-à-vis des agresseurs (Boller et Felix, 2009).

De par son organisation, la membrane plasmique est une structure très dynamique. C'est pourquoi l'équipe *Dynamique membranaire et réponse aux stress biotiques* de l'UMR *plante-microbe-environnement*, s'intéresse aux conséquences des interactions entre les cellules végétales et les microorganismes sur les propriétés de la membrane plasmique, et en particulier sur la fluidité membranaire.

¹ UMR1088 - PME - plante microbe environnement - INRA -F-21065 Dijon ✉ christophe.der@dijon.inra.fr

Pour évaluer la fluidité membranaire, nous avons suivi la mobilité latérale d'une molécule fluorescente, la di-4-ANEPPDHQ, par des expériences de recouvrement de fluorescence après photoblanchiment (Fluorescent recovery after photobleaching ou FRAP).

Pour la mise en œuvre de cette technique, il a été nécessaire de mettre au point un protocole qui prend en compte les propriétés de la sonde fluorescente et permet d'éviter les difficultés inhérentes aux caractéristiques de notre modèle d'étude : des cellules BY-2 de tabac cultivées en suspension, sous agitation et non-adhérentes.

Nous décrivons ici un protocole d'acquisition et d'analyse des données de FRAP, utilisables sur des cellules végétales en suspension.

1. Matériels et méthodes

1.1 Culture des cellules

Les cellules de *Nicotiana tabacum* cv. Bright Yellow 2 (BY-2) sont cultivées dans le milieu Murashige et Skoog (Murashige *et al.*, 1962), pH 5.6 complété avec 1 mg.l⁻¹ de thiamine-HCl, 0,2 mg.l⁻¹ d'acide 2,4 dichlorophénylacétique, 100 mg.l⁻¹ myo-inositol, 30 g.l⁻¹ de sucrose, 200 mg.l⁻¹ de KH₂PO₄ et 2 g.l⁻¹ de MES, sous lumière continue (200 μE m⁻² sec⁻¹) et sous agitation rotative (140 rpm).

1.2 Microscope confocal à balayage laser

Nous avons utilisé un microscope droit confocal à balayage laser Leica TCS SP2-AOBS (Leica Microsystems, Wetzlar, Allemagne) équipé d'un laser Argon (longueur d'onde d'excitation 488 nm). Les images sont réalisées avec un objectif HCX PC apo CS 40x/1.25-0.75 à immersion à huile. L'émission de fluorescence est récupérée dans une plage de longueur d'ondes de 510 à 700 nm.

1.3 Sonde fluorescente : la di-4-ANEPPDHQ

La di-4-ANEPPDHQ ou 1-[2-Hydroxy-3-(N,N-di-méthyl-N-hydroxyéthyl) ammoniopropyl]-4-[β-[2-(di-n-butylamino)-6-naphtyl] vinyl] pyridinium dibromide est une sonde styryl qui a été développée pour détecter des changements de potentiel transmembranaire (Obaid *et al.*, 2004). Elle est aussi utilisée pour mettre en évidence des domaines lipidiques membranaires enrichis en stérols (Jin *et al.*, 2006 ; Roche *et al.*, 2008 ; Liu *et al.*, 2009).

Sa haute affinité pour les membranes lui permet de se charger facilement dans la membrane plasmique, en s'insérant dans l'un des feuillet. Sa double charge positive retardant le passage du feuillet externe au feuillet interne, l'internalisation cellulaire de cette sonde n'est pas immédiate (Jin *et al.*, 2006). Le marquage se fait donc en quelques secondes et de façon spécifique à la membrane plasmique (**figure 1**).

Du point de vue de sa fluorescence, cette molécule peut être excitée avec un simple photon dans le bleu (Jin *et al.*, 2006). Elle n'est pratiquement pas fluorescente en dehors de la membrane plasmique (Jin *et al.*, 2006), d'où son bon ratio signal/bruit. Dans les cellules BY2 équilibrées dans le milieu I2 (§ 1.4), avec une excitation au laser argon à 488 nm, le pic d'émission se situe entre 570 et 590 nm. Dans nos expériences, pour éviter les perturbations spectrales de la sonde dues aux changements biophysiques de la membrane plasmique, nous avons choisi une bande d'émission assez large (510 à 700 nm).

La di-4-ANEPPDHQ (molecular probes) est préparée en solution stock à 1,5 mM dans du diméthylsulfoxyde (DMSO), et utilisée à la concentration finale de 1,5 μ M.

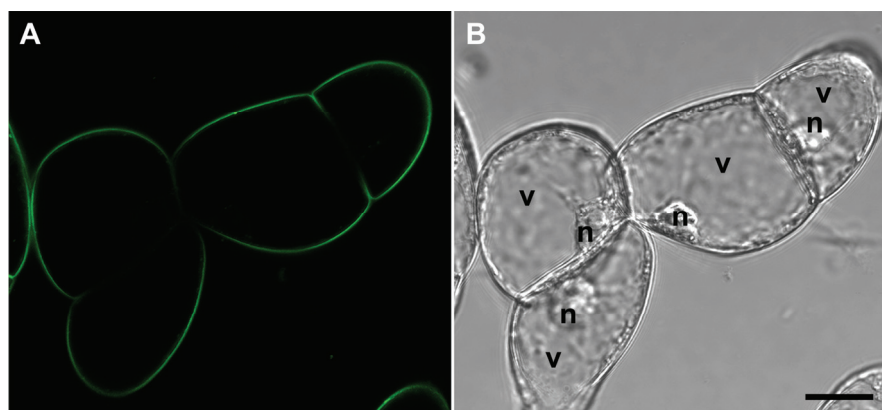


Figure 1 : Marquage de cellules BY-2 de tabac avec la sonde di-4-ANEPPDHQ. (A) fluorescence de la sonde au niveau de la membrane plasmique, excitation à 488 nm ; (B) les mêmes cellules analysées par contraste interférentiel différentiel (DIC). (n) noyau, (v) vacuole, la barre représente 20 μ m.

1.4 Préparation et marquage des cellules

Les expériences sont réalisées sur des cellules en suspension BY-2 de tabac âgées de 7 jours, filtrées et remises en suspension à raison de 1 g pour 10 ml de tampon I2 (tampon MES 2 mM, pH 5,8 contenant 175 mM mannitol, 0,5 mM CaCl₂, 0,5 mM K₂SO₄), sous agitation rotative (140rpm) pendant 3h.

Un ml de cellules est prélevé et marqué avec la sonde di-4-ANEPPDHQ 1,5 μ M durant environ 60 secondes. Les cellules sont ensuite centrifugées manuellement (avec une vitesse inférieure à 100 g). Le surnageant est éliminé et remplacé par du tampon I2.

1.5 Recouvrement de fluorescence après photoblanchiment ou FRAP

1.5.a Principe

La technique de FRAP consiste à photo-détruire les fluorophores (destruction de la fluorescence) d'une zone limitée (**figure 2A et B**), par une courte et forte illumination laser puis de mesurer le retour de la fluorescence dans cette zone (**figure 2C**), à condition que les fluorophores puissent diffuser à travers l'échantillon. Ce retour de fluorescence est dû au remplacement des molécules photoblanchies par des molécules intactes venant des zones environnantes.

La cinétique de retour de fluorescence est représentée sous forme de courbes (**figure 3**) à partir desquelles sont déduits le temps de demi-recouvrement (temps mis pour retrouver la moitié de la fluorescence finale) et la fraction mobile (part des molécules fluorescentes diffusant).

Dans notre cas, la fluidité de la membrane plasmique est étudiée grâce à l'examen de la mobilité latérale (ou diffusion) d'une sonde fluorescente incorporée dans la membrane plasmique.

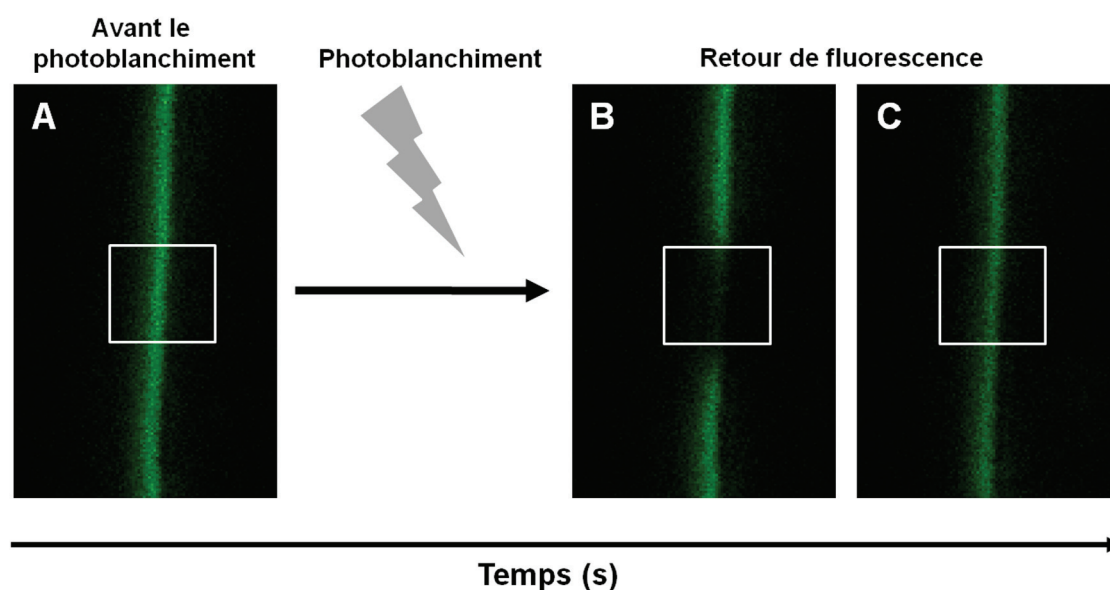


Figure 2 : Principe du FRAP. La sonde fluorescente incorporée dans la membrane plasmique (A) est photoblanchie dans une zone donnée (B, carré à bordure blanche). Le retour de fluorescence dans cette zone est observé (C) dans le temps

1.5.b Acquisition des données (tableau1)

Pour réaliser des expériences de FRAP et obtenir des données exploitables sur des cellules en suspension, il faut tenir compte de leur non-adhésion à la lame ou à la lamelle, et donc des possibles mouvements qui peuvent en résulter. Pour maintenir les cellules dans un état physiologique convenable, il est aussi nécessaire de limiter le temps passé entre lame et lamelle. Enfin, pour comparer les expériences entre elles, il est important qu'elles se déroulent toutes dans les mêmes conditions.

- Réglage du laser

Le laser est utilisé à deux intensités : l'une pour le photoblanchiment, l'autre pour l'acquisition des données sur le retour de fluorescence.

Dans le premier cas, l'intensité doit être assez forte pour détruire le fluorophore.

Dans le second cas, elle doit fournir les informations nécessaires tout en étant la plus faible possible, afin : i) d'éviter de photoblanchir l'échantillon par le balayage laser lors des prises de vue successives ; ii) de ne pas saturer le signal, ce qui perturberait le traitement des données,

Dans nos expériences, avec la concentration de sonde utilisée, une puissance de laser de 8 % est suffisante pour obtenir un bon marquage de la membrane plasmique (figure 1A).

- Choix des cellules

Il faut identifier les cellules d'intérêt et faire une mise au point dans la zone où la membrane plasmique apparaît dans une section la plus transversale possible (figure 2). Il est préférable de ne réaliser le FRAP que sur une ou deux cellules par lame afin d'éviter tout stress dû au temps passé entre lame et lamelle.

- Choix de la zone d'intérêt (ROI : region of interest) à photoblanchir

Afin de focaliser le laser sur une région donnée, et augmenter l'efficacité du blanchiment, nous réalisons un zoom x16 sur la membrane.

La ROI est définie comme un carré de 2 μm x 2 μm . Cette surface permet de prendre la largeur de la membrane et une bordure de chaque côté, pour limiter les effets d'éventuels mouvements latéraux de la cellule.

Une zone contrôle de même surface est délimitée. Cette zone ne sera pas photoblanchie, mais subira le même nombre de balayages laser, pour réaliser les prises de vue, que la zone blanchie. Elle servira donc de témoin pour évaluer le blanchiment dû aux prises de vue. Il est recommandé de la positionner sur la membrane plasmique d'une cellule indépendante, proche de la cellule subissant le photoblanchiment.

- Vitesse de balayage et taille de l'image

La vitesse de balayage du laser peut avoir une grande incidence sur les résultats : une vitesse trop lente peut augmenter le photoblanchiment, un balayage trop rapide donne un ratio signal sur bruit moins bon. Il est donc important de bien définir cette vitesse de balayage en choisissant judicieusement le format d'acquisition des images et le moyennage de celles-ci. Plus une image est grande, ou plus elle est moyennée, plus la durée de balayage augmente.

Tableau 1 : Conditions expérimentales d'acquisition des données de FRAP sur cellules BY-2

Objectif	40x NA 1.25 à immersion à huile
Zoom	x 16
Format des images	512 x 512 pixels
Longueur d'onde d'excitation	488 nm
Longueur d'onde d'émission	510-700 nm
Intensité du laser pour le pré et le post-blanchiment	8 %
Intensité du laser pour le blanchiment	100 %
Forme et taille de la ROI	Carré de 2 μm x 2 μm
Vitesse de balayage	800 Hz
Moyennage des images	aucun
Pré-blanchiment	5 images x 0,828 s
Blanchiment	1 image x 0,828 s
Premier Post-blanchiment	10 images x 1,828 s
Deuxième Post-blanchiment	10 images x 9,828s

- Détermination du nombre de données à récupérer

L'expérience de FRAP se décompose en 3 phases :

- le préblanchiment (**figure 2A**) permet de définir l'intensité de fluorescence de départ (F_i) dans les ROI ;

-le blanchiment (**figure 2B**) correspond au blanchiment proprement dit. Une des 2 zones est aveuglée en poussant la puissance laser au maximum ;

-le post-blanchiment (**figure 2C**) correspond au retour de la fluorescence dans la zone blanchie. Il est nécessaire d'optimiser le nombre d'images pour avoir le maximum d'informations sans continuer à photoblanchir les cellules par le nombre de prises de vue et d'éviter de laisser les cellules trop longtemps entre lame et lamelle. La première partie de la courbe est la plus importante, c'est à ce moment qu'il convient de récupérer le maximum de

données. Plus on s'approche du plateau (**figure 3**), plus les points peuvent être espacés. Nous avons donc défini 2 fréquences d'enregistrement des valeurs (**tableau 1**).

1.5.c Analyse des données

- Estimation des paramètres

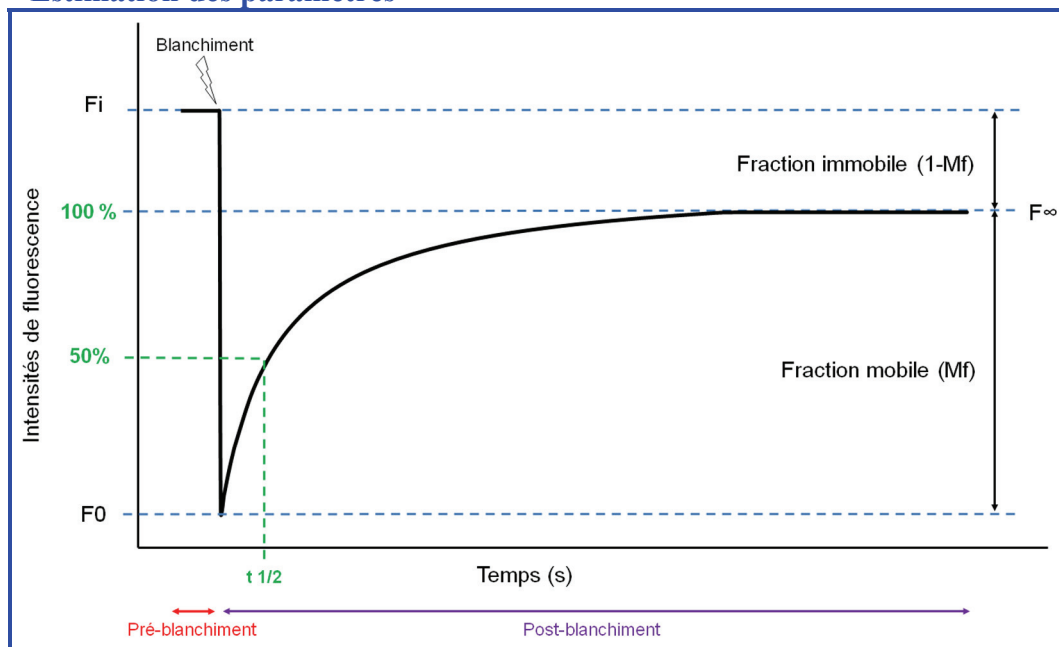


Figure 3 : courbe de recouvrement de fluorescence. F_i , F_0 et F_∞ étant respectivement les intensités de fluorescence avant le blanchiment, immédiatement après le blanchiment et à l'équilibre, $t_{1/2}$ représente le temps de demi-recouvrement de la fluorescence.

.le temps de demi-recouvrement ou $t_{1/2}$ correspond au temps nécessaire à la récupération de 50% de l'intensité au plateau (asymptote) de recouvrement de la fluorescence (F_∞) (**figure 3**). La courbe expérimentale est ajustée (Feder *et al.*, 1996) à l'aide de la formule :

$$F(t) = (F_0 + F_\infty \times (t / t_{1/2})) / (1 + (t / t_{1/2})) \quad (1)$$

On en déduit le F_0 , F_∞ et $t_{1/2}$, F_∞ correspondant au plateau du recouvrement de fluorescence, F_0 étant l'intensité immédiatement après le blanchiment (**figure 3**).

.la fraction mobile ou M_f : certaines molécules fluorescentes ne diffusent pas, elles constituent la fraction immobile. La fraction mobile est donc représentée par : 1-fraction immobile. Elle est estimée par la formule :

$$M_f = (F_\infty - F_0) / (F_i - F_0) \quad (2)$$

où F_i est l'intensité du pré-blanchiment (**figure 3**).

.la normalisation selon la méthode d'Axelrod *et al.* (1976) où le plateau est considéré à 100%. Elle permettra de comparer les courbes entre elles. Elle est calculée avec la formule :

$$F_n(t) = (F(t) - F_0) / (F_\infty - F_0) \quad (3)$$

avec $F(t)$ intensité de fluorescence au temps t dans la ROI blanchie.

2. Exemple de traitement d'une courbe

Les courbes présentées à la **figure 4A** ont été obtenues avec les conditions décrites dans la partie « matériels et méthodes ». Sur la courbe de la zone blanchie, la fluorescence chute après le blanchiment, puis revient régulièrement pour atteindre un plateau, alors que l'intensité de fluorescence dans la zone non-blanchie reste stable.

À partir de ces données, dans un premier temps, seule la partie correspondant au retour de la fluorescence est prise en compte. La courbe brute est alors ajustée avec la formule (1) (**figure 4B**). À partir de cette courbe ajustée, trois paramètres sont déduits : le F_0 , le F_∞ et le $t_{1/2}$ (**figure 4C**). Avec les données brutes, le F_0 et le F_∞ , la courbe peut être normalisée selon la formule (3) (**figure 4E**) et pourra ainsi être comparée à d'autres courbes. La fraction mobile est déduite à partir de la formule (2) (**figure 4D**).

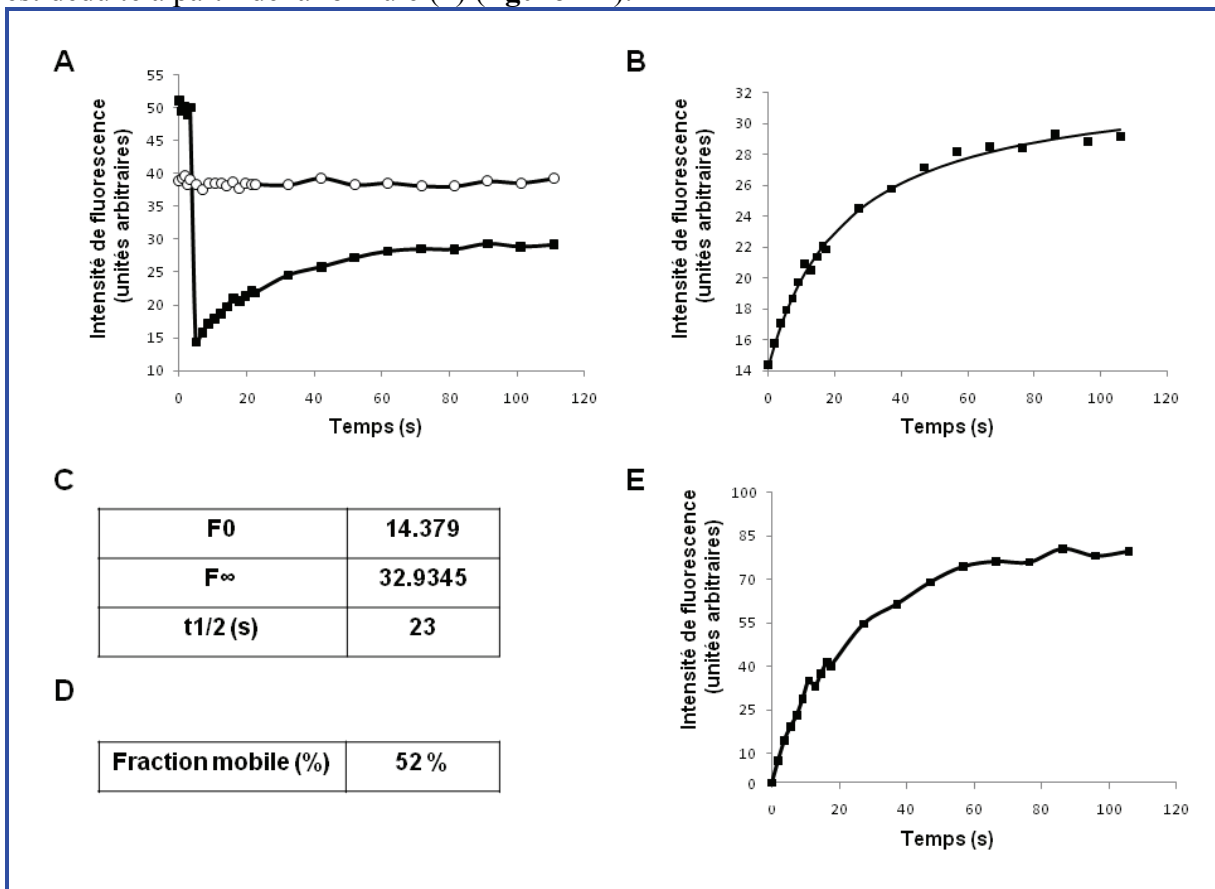


Figure 4 : exploitation de données de FRAP. (A) données brutes, (○) zone témoin n'ayant pas subi de photo-blanchiment, (■) zone ayant été blanchie ; (B) courbe ajustée selon la formule (1) ; (C) paramètres déduits de la courbe ajustée, F_0 pour l'intensité du premier point après le blanchiment, F_∞ pour l'intensité au plateau, et $t_{1/2}$ pour le temps de demi-recouvrement de la fluorescence ; (D) fraction mobile calculée à partir des paramètres de la courbe et de la formule (2) ; (E) courbe normalisée par la formule (3)

Conclusion

Le protocole décrit ici permet d'estimer la fluidité de la membrane plasmique des cellules BY-2 de tabac en suspension par la technique de FRAP.

En outre, de par ses propriétés, la sonde di-4-ANEPPDHQ s'avère être un bon marqueur pour ce type d'expérience : elle est stable, spécifique de la membrane plasmique et elle possède un bon ratio signal/bruit.

Toutefois, le FRAP est une méthode sensible à la moindre perturbation au cours de l'acquisition de données. Il convient donc de faire tous les contrôles nécessaires mentionnés et de répéter les expériences afin de s'assurer de leur reproductibilité.

Grâce à ce protocole, nous avons également pu étudier l'action de molécules, purifiées à partir de microorganismes, sur la membrane plasmique, telle la filipine III complexant les stéroïdes (Bonneau *et al.*, 2010). À l'avenir, d'autres molécules pourront être testées sur des cellules en suspension, aussi bien sur notre modèle que sur des cellules autres que les BY-2.

Bibliographie

- Axelrod D., Koppel D.E., Schlessinger J., Elson E., Webb W.W., (1976) Mobility measurement by analysis of fluorescence photobleaching recovery kinetics. *Biophysical Journal* 16: 1055-1069
- Boller T., Felix G., (2009) A renaissance of elicitors: perception of microbe-associated molecular patterns and danger signals by pattern-recognition receptors. *Annual Review of Plant Biology* 60: 379-406
- Bonneau L., Gerbeau-Pissot P., Thomas D., Der C., Lherminier J., Bourque S., Roche Y., Simon-Plas F., (2010) Plasma membrane sterol complexation, generated by filipin, triggers signaling responses in tobacco cells. *Biochimica et Biophysica Acta* 1798 :2150-2159
- Feder T.J., Brust-Mascher I., Slattery J.P., Baird B., Webb W.W., (1996) Constrained diffusion or immobile fraction on cell surfaces: a new interpretation. *Biophysical Journal* 70: 2767-2773
- Jin L., Millard A.C., Wuskell J.P., Dong X., Wu D., Clark H.A., Loew L.M., (2006) Characterization and application of a new optical probe for membrane lipid domains. *Biophysical Journal*. 90: 2563-2575
- Liu P., Li R.L., Zhang L., Wang Q.L., Niehaus K., Baluska F., Samaj J., Lin J.X., (2009) Lipid microdomain polarization is required for NADPH oxidase-dependent ROS signaling in *Picea meyeri* pollen tube tip growth. *Plant Journal* 60: 303-13
- Murashige T., Skoog F., (1962) A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiologia Plantarum* 15: 473-497
- Obaid A.L., Loew L.M., Wuskell J.P., Salzberg B.M. (2004) Novel naphthylstyryl-pyridium potentiometric dyes offer advantages for neural network analysis. *Journal of Neuroscience methods* 134: 179-190
- Roche Y., Gerbeau-Pissot P., Buhot B., Thomas D., Bonneau L., Gresti J., Mongrand S., Perrier-Cornet J.-M., Simon-Plas F. (2008) Depletion of phytosterols from the plant plasma membrane provides evidence for disruption of lipid rafts. *FASEB Journal* 22: 3980-3991

Apport de l'imagerie cellulaire à l'étude des interactions entre la bactérie intra-phloémique *Spiroplasma citri* et les cellules de son insecte vecteur *Circulifer haematoceps*

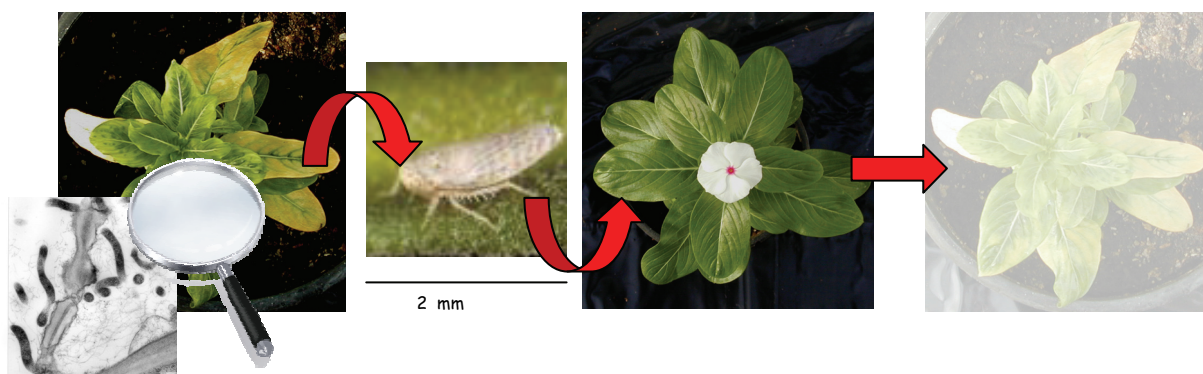
Brigitte Batailler¹ ² et Nathalie Arricau-Bouvery¹

Résumé : La cicadelle *Circulifer haematoceps* est le vecteur naturel de *Spiroplasma citri*, bactérie phytopathogène responsable du stubborn des agrumes et strictement localisée dans les tubes criblés du phloème. Une lignée cellulaire stable de *Circulifer haematoceps* a été obtenue au laboratoire et nous avons abordé l'étude des interactions entre les cellules d'insecte en culture et *S. citri* par le biais de deux approches complémentaires d'imagerie : l'immunofluorescence en microscopie confocale d'une part, la microscopie électronique à transmission d'autre part.

Les protocoles de préparation des échantillons ont été adaptés à notre problématique, à savoir le suivi de l'invasion de cellules en culture par des bactéries, et pour cela nous avons cherché à perturber le moins possible le modèle d'étude.

Les avantages/inconvénients des deux types d'approche, photonique et électronique, sont discutés ainsi que la perspective de pouvoir plus étroitement les corrélés.

Mots-clés : Microscopie confocale à balayage laser (MCBL), Microscopie électronique à transmission (MET), culture cellulaire adhérente, *Circulifer haematoceps*, *Spiroplasma citri*.



Propagation, plante à plante, de la bactérie *Spiroplasma citri* par son insecte vecteur, *Circulifer haematoceps* (Photos JL Danet, B Batailler)

¹ UMR 1090 Génomique Diversité et Pouvoir Pathogène – Equipe Mollicutes - INRA-F-33883 Villenave d'Ornon
☎ 05 57 12 23 51 ✉ Brigitte.Batailler@bordeaux.inra.fr

² Pôle Imagerie du Végétal, Bordeaux Imaging Center

Introduction

Dans la nature, la cicadelle *Circulifer haematoceps* est responsable de la dissémination de *Spiroplasma citri*, bactérie phytopathogène de la classe des Mollicutes et agent causal du stubborn des agrumes. La bactérie est strictement localisée dans les cellules du phloème, tissu conducteur de la sève élaborée. C'est en prélevant la sève d'une plante malade puis en se nourrissant sur une plante saine que l'insecte piqueur-suceur propage la maladie. Les souches bactériennes transmissibles sont ingérées dans l'intestin moyen de l'insecte ; elles traversent ensuite la barrière intestinale, se multiplient dans l'hémolymph puis envahissent les glandes salivaires (Hogenhout *et al.*, 2008).

Les mécanismes cellulaires impliqués dans la transmission des bactéries intra-phloémiques par leur insecte vecteur sont encore mal connus. Comme l'ensemble des bactéries de la classe des Mollicutes à laquelle ils appartiennent, les spiroplasmes (genre *Spiroplasma*), présentent la particularité d'être dépourvus de paroi. Leur membrane plasmique se trouve donc directement au contact du milieu extérieur et l'efficacité de transmission est en partie déterminée par des interactions spécifiques entre les protéines membranaires de surface de la bactérie et les cellules eucaryotes de son insecte vecteur. Les spiroplasmes sont en outre caractérisés par une morphologie hélicoïdale et ils sont pourvus de fibrilles cytoplasmiques qui leur confèrent la motilité (Cole *et al.*, 1973 - Trachtenberg *et al.*, 2003).

Le modèle utilisé dans notre étude repose, d'une part sur l'établissement d'une lignée cellulaire stable de *Circulifer haematoceps*, dénommée Ciha-1, et d'autre part sur *S. citri*, à ce jour seule bactérie intra-phloémique cultivable *in vitro* et disponible en culture pure.

Dans le but de mettre en évidence l'adhésion puis l'internalisation des spiroplasmes lors de la colonisation des cellules de l'insecte vecteur, nous avons fait appel à deux techniques de microscopie, l'immunofluorescence en microscopie confocale à balayage laser et la microscopie électronique à transmission (MET).

Les mises au point nécessaires préalables à ce travail ont été de définir les conditions d'obtention d'une lignée cellulaire Ciha-1 de *Circulifer haematoceps* et de déterminer les modalités d'infection des cellules d'insecte par *S. citri*.

Les adaptations techniques en microscopie ont porté, 1) sur l'optimisation d'un protocole d'immunofluorescence en vue d'immunolocaliser *in situ* *S. citri* lors des étapes de l'infection des cellules de l'hôte et 2) sur les conditions de préparation des échantillons en vue de leur étude en MET. Les protocoles retenus visent à maintenir les échantillons dans un état le plus proche possible des conditions dans lesquelles se déroulent les interactions cellule d'insecte-spiroplasma *ex-vivo*.

1. Obtention de la lignée cellulaire Ciha-1 de *Circulifer haematoceps*

1.1 Traitement des oeufs de *Circulifer haematoceps*

Les cicadelles saines (**figure 1a**) sont élevées en insectarium, sur giroflées, à raison de 50 femelles par plante. La photopériode et la température sont fixées à 16 h par jour à 27°C, 8 h par nuit à 24°C. Huit à dix jours après la ponte, les embryons présentant une tache oculaire brun-rouge (**figure 1b**) sont prélevés sur les nervures à l'aide d'une aiguille fine. Une centaine d'oeufs sont collectés par plante ; ils sont regroupés dans un tube pour microcentrifugation contenant 1mL de milieu de Schneider pour drosophile (*Schneider's drosophila medium*, Gibco BRL).

La surface des œufs est stérilisée par une solution d'hypochlorite de sodium à 20% puis traitée à l'éthanol 70 %. Les œufs sont ensuite délicatement broyés dans 100 µl de milieu dit « milieu de culture cicadelle » de base (*milieu de Schneider* : 400 ml, *milieu de Grace* (*Grace's insect medium supplemented, Gibco BRL*) : 50 ml, *serum de veau foetal inactivé à 56°C* (*FBS, Gibco BRL*) : 50 ml, *complément G5* : 2,5 ml (*Invitrogen*)) additionné d'antibiotiques (*fungizone* 1,25 µg/ml, *pénicilline - streptomycine* 50 µg/ml). Le broyat est centrifugé, re-suspendu dans un tampon de dissociation cellulaire (*Invitrogen*) et incubé à 28°C. Après une nouvelle centrifugation et reprise dans du milieu neuf, le volume total, chorions inclus, est transféré dans un flacon de culture stérile et incubé à 28°C. Le jour suivant, le milieu de culture est remplacé par du milieu neuf puis les 2/3 du milieu sont renouvelés chaque semaine jusqu'à l'apparition des premières colonies.

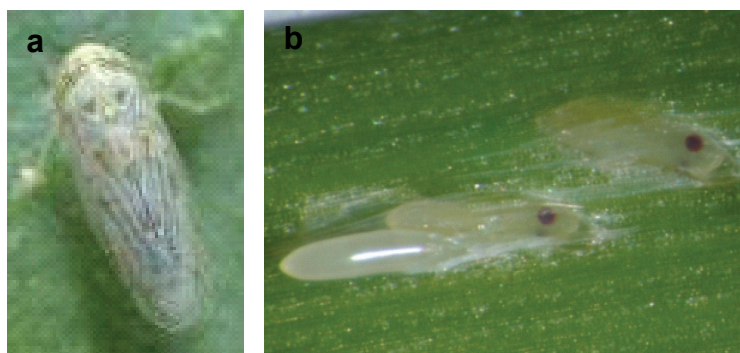
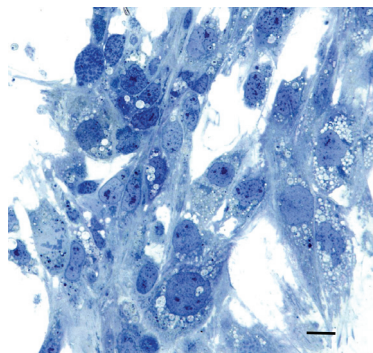


Figure 1 : *Circulifer haematoceps* - a) insecte adulte ; b) œufs embryonnés âgés de 8 jours

1.2 Entretien de la lignée cellulaire

Après environ quatre mois de mise en culture, la surface d'une colonie a atteint environ 4 mm². Les cellules sont trypsinées avec la Trypsine Like Enzyme (TrypLE, Gibco BRL) afin d'être transférées dans les puits d'une plaque de culture P24. Les cellules sont maintenues en « milieu de culture cicadelle » de base additionné d'antibiotiques. Après environ 3 mois, le contenu de plusieurs puits est rassemblé pour ensemercer un flacon de culture de 25 ou 75 cm². Les cellules de la lignée sont ensuite cultivées à 32°C et repiquées tous les 7 jours avec un changement additionnel de milieu une fois par semaine. Plusieurs aliquots de 1 ml de cellules en culture sont congelés dans de l'azote liquide et conservés comme référence.



La lignée Ciha-1, produite à partir d'embryons de *Circulifer haematoceps*, vecteur naturel de *Spiroplasma citri*, est la première obtenue pour cet insecte. Les cellules, de type épithélial, adhèrent au support de culture et se répartissent en mono-couche (**figure 2**).

Figure 2 : lignée cellulaire de *Circulifer haematoceps* observée en microscopie photonique (coloration au bleu de toluidine). Barre d'échelle, 10 µm

2. Inoculation des cellules Ciha-1 par la bactérie *Spiroplasma citri*

2.1 Souche de *Spiroplasma citri*

La bactérie *S. citri* est cultivée en milieu SP4 liquide (Tully *et al.*, 1977) modifié, sans extrait de levure. Le milieu est ensemencé au 1/10 à partir d'une culture congelée ou d'une pré-culture et incubé à 32°C sans agitation. En présence de rouge de phénol, le milieu vire du rouge au jaune ce qui permet de suivre la multiplication bactérienne.

La veille de l'infection, l'inoculum est repiqué dans du milieu SP4, au 1/2, 1/5 ou 1/10, selon la croissance de la souche.

2.2 Inoculation des cellules Ciha-1 par *Spiroplasma citri*

Les cellules Ciha-1 sont préparées deux jours avant de réaliser l'infection. L'état des cellules est d'abord vérifié au microscope inversé (étalement, confluence, absence d'amas). Les cellules sont trypsinées, mises en suspension dans du « milieu de culture cicadelle » de base, sans antibiotiques, puis sont réparties dans une plaque de culture P24 garnie de lamelles de verre circulaires de diamètre 12 mm, à raison de 1 ml par puits. Les cellules Ciha-1 adhèrent sur les lamelles de verre déposées au fond des puits. Elles sont maintenues 24 à 48 h à 32°C.

L'état de l'inoculum *S. citri* est vérifié juste avant de réaliser l'inoculation. L'observation d'une goutte de suspension bactérienne au microscope à fond noir permet de vérifier que les bactéries sont bien en phase exponentielle de croissance, spiralées, motiles.

Au moment de l'inoculation, les cellules Ciha-1 sont lavées une fois en milieu de Schneider puis ensemencées avec la souche de *S. citri*, elle-même diluée dans « du milieu de culture cicadelle » de base (i) 20 fois pour l'immunofluorescence ou (ii) quatre fois pour la MET. Pour ces expérimentations, les spiroplasmes sont laissés en contact avec les cellules Ciha-1 à 32°C pendant 4h ou 18h, le ratio bactéries/cellules étant alors respectivement de l'ordre de 50 ou 250.

3. Etude en microscopie confocale à balayage laser

3.1 Protocole d'immunofluorescence

Le protocole d'immunofluorescence retenu fait intervenir un double immunomarquage qui, à l'aide de deux marqueurs distincts, permet de différencier les spiroplasmes extracellulaires des spiroplasmes intracellulaires. Il comporte trois étapes principales :

- l'incubation avec un anticorps polyclonal primaire anti-*S.citri* révélé par un anticorps secondaire couplé à l'Alexa 633 ;
- la perméabilisation des membranes des cellules Ciha-1 par le triton X-100 ;
- la post-incubation avec le même anticorps primaire anti-*S.citri* révélé alors par un anticorps secondaire couplé à l'Alexa 488.

Toutes les étapes sont réalisées à température ambiante en plaque de culture P24, qui présente l'avantage de consommer de petits volumes de réactifs. La plaque P24 est déposée sur un agitateur balancelle à chaque lavage.

Les cellules sont lavées trois fois en milieu de Schneider puis fixées pendant 15 mn par du paraformaldéhyde dilué à 4 % dans ce même milieu. Après trois lavages en tampon PBS (Phosphate Buffer Saline sans Ca-Mg, pH 7,2, Invitrogen) et 15 min de saturation par de la BSA (Bovine Serum Albumin) (1 % en PBS) les cellules sont incubées avec 200 µL de serum de lapin anti-*S.citri* dilué au 1/500^{ème} dans du PBS – 1 % BSA pendant 30 min. Les cellules

sont lavées trois fois en PBS puis incubées 30 min à l'obscurité avec 200 µl d'anticorps de chèvre anti-anticorps de lapin couplé à l'Alexa 633 (Invitrogen) dilué au 1/200^{ème}. Seules les bactéries extracellulaires sont marquées par l'Alexa 633. Après trois lavages en PBS, les cellules sont perméabilisées pendant 15 mn au triton X-100 0,2 % dans le PBS-1 % BSA, lavées deux fois en PBS puis post-incubées avec 200 µl de serum de lapin anti-*S.citri* dilué au 1/500^{ème} dans du PBS – 1 % BSA pendant 30 mn. Les cellules sont lavées trois fois en PBS puis incubées 30 mn à l'obscurité avec 200µL d'anticorps de chèvre anti-anticorps de lapin couplé à l'Alexa 488 (Invitrogen) dilué au 1/200^{ème}, en mélange avec de la phalloïdine-Alexa 568 diluée au 1/40 (Invitrogen) permettant de visualiser les filaments d'actine. Les bactéries intracellulaires sont marquées par l'Alexa 488 ainsi que les épitopes des bactéries extracellulaires qui n'ont pas été saturés par la première exposition aux anti-corps spécifiques. Les lamelles sont délicatement retirées des puits avec une pince fine, lavées par immersion dans un bécher d'eau désionisée, égouttées sur papier absorbant et déposées, cellules vers le bas, dans une goutte d'un milieu de montage retardant le photoblanchiment des fluorophores, ProLong Gold reagent (Invitrogen), déposée sur une lame de verre. La lamelle est lutée avec du vernis à ongles. La lame peut ainsi se conserver deux jours à 4°C, à l'obscurité. Deux types de contrôle ont été réalisés afin d'évaluer la spécificité de l'immunomarquage: un premier contrôle « cellules saines » sur cellules Ciha-1 non inoculées par *S. citri*, un deuxième contrôle sur cellules Ciha-1 inoculées, mais avec omission de l'anticorps primaire anti-*S.citri*.

3.2 Résultats

3.2.a Conditions d'acquisition

Les acquisitions ont été réalisées sur un microscope confocal TCS SP2 (Leica). Dans l'exemple présenté (§ 3.2.b), les images en format 1024 × 1024 correspondent à un seul plan focal et l'acquisition a été réalisée de façon séquentielle, image par image, avec un objectif APO × 40, immersion eau, à ouverture numérique 0,8.

Le tableau ci-dessous résume les principaux paramètres d'acquisition

<i>Fluorochrome</i>	<i>Alexa 488</i>	<i>Alexa 568</i>	<i>Alexa 633</i>
<i>Maximum absorption</i>	495	578	632
<i>Maximum émission</i>	519	603	645
<i>Bande passante utilisée</i>	496 – 553 (PMT 1)	579 -634 (PMT 2)	642 – 740 (PMT 3)
<i>Éléments marqués</i>	<i>S. citri</i> intracellulaire et <i>S.citri</i> extracellulaire	actine	<i>S. citri</i> extracellulaire
<i>Code couleur utilisé</i>	vert	rouge	bleu

3.2.b Résultats

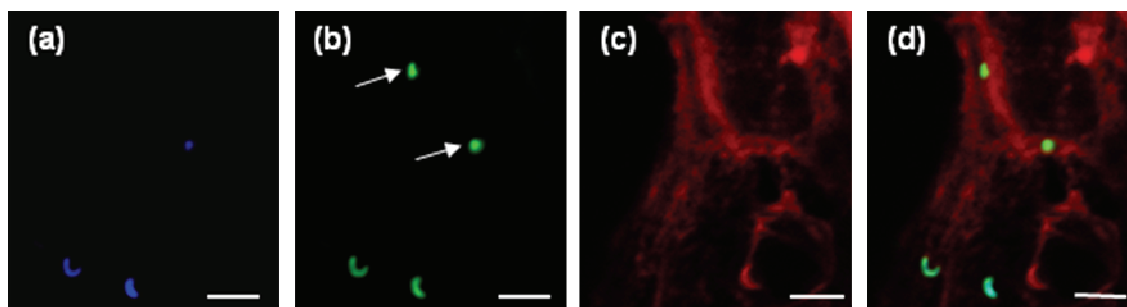


Figure 3 : observation en microscopie confocale de cellules *Ciha-1* infectées par *S. citri*-GII3
 (a) *S. citri* extracellulaire - Alexa 633; (b) *S. citri* intracellulaire (flèches) - Alexa 488(après perméabilisation)
 (c) Actine - Phalloidine – Alexa 514 (d) image superposée. Barres d'échelle : 5 μ m

La méthode de double-immunomarquage a été appliquée sur cellules adhérentes *Ciha-1* après 4 h d'infection par la souche sauvage *S. citri*-GII3. Les spiroplasmes extracellulaires, codés en bleu, sont détectés dans le canal 642-740 nm (**figure 3a**). Les spiroplasmes intracellulaires, codés en vert, sont détectés dans le canal 496-553 nm (**figure 3b**). On note que des spiroplasmes extracellulaires sont également détectés lors de la seconde incubation avec l'anti-corps primaire spécifique, dans ce canal. Ceci nous indique que tous les épitopes des bactéries extracellulaires n'ont pas été saturés par l'anticorps anti-*S. citri* lors de la première incubation. L'actine, codée en rouge, est détectée dans le canal 579-634 nm (**figure 3c**). Ces informations se retrouvent sur l'image superposée des trois canaux (**figure 3d**) ; sur cette image, les spiroplasmes intracellulaires, marqués uniquement par l'Alexa 488, sont verts, les spiroplasmes extracellulaires, marqués par l'Alexa 633 puis par l'Alexa 488, apparaissent en cyan (bleu + vert).

Aucun marquage n'est détecté sur les cellules *Ciha-1* non infectées ainsi que sur les contrôles pour lesquels l'anticorps primaire a été omis.

Par ailleurs, nous avons noté qu'à l'échelle de la microscopie confocale, les bactéries présentaient une morphologie différente selon leur localisation, ovoïde dans le cas des spiroplasmes intracellulaires, en forme de « virgule » dans le cas des bactéries extracellulaires.

4. Etude en microscopie électronique à transmission

4.1 Particularités du mode opératoire

3.1.a Manipulation des cellules

Au cours de la phase de mise au point, nous avons testé deux façons de manipuler les cellules de *C. haematoceps* : soit centrifugées en culot, soit maintenues en mono-couches sur un support de culture.

Dans le premier cas, après deux lavages en PBS (PBS sans Ca-Mg, pH 7,2, Invitrogen) dans le flacon de culture, les cellules sont trypsinées (Trypsine Invitrogen), transférées en tubes eppendorfs, centrifugées 5 mn à 3000 rpm, lavées en tampon PBS puis centrifugées à nouveau 5 mn à 3000 rpm. La fixation chimique des culots humides est réalisée directement dans les tubes eppendorff, enrobés ou non en agar (selon qu'ils s'émiettent ou pas). Les culots sont ensuite transférés dans des piluliers en verre pour subir une déshydratation et une imprégnation en résine. Dans le deuxième cas, les cellules trypsinées et en suspension dans le

« milieu de culture cicadelle » sont prélevées avec une pipette stérile et déposées sur le support de culture à raison de 1 ml par puits (§ 2.2)

La trypsine utilisée dans les deux cas (Invitrogen) a été choisie parce qu'elle induit une protéolyse superficielle et ne dénature pas la membrane plasmique des cellules Ciha-1.

Nous avons finalement retenu la solution n°2 (mono-couches) qui présente l'avantage de conserver la disposition en une monocouche des cellules adhérentes et de préserver leurs caractères morphologiques, en particulier les extensions périphériques de cytoplasme. Avec la solution n°1 (culots), les cellules sont trop proches les unes des autres, voire jointives, ce qui rend difficile l'observation de la périphérie des cellules et ne permet pas toujours de différencier les zones intracellulaires des zones intercellulaires.

4.1.b Type de support de culture

Trois types de support ont été testés :

- 1 - lamelles de verre : soit de diamètre 22 × 22 mm pour plaque de culture P6, soit de diamètre 12 mm pour plaque P24 ;
- 2 - petites boîtes de Pétri en verre « stériplan », à fond plat, de diamètre 40 mm ;
- 3 - membrane d'Aclar : l'aclar est un film plastique transparent, biochimiquement inerte, non autofluorescent et pouvant être stérilisé à l'éthanol.

Les cellules de *Circulifer haematoceps* se sont bien développées sur les trois types de support testés. Les lamelles de verre ont l'avantage d'être les moins coûteuses. Les boîtes de Pétri ont l'intérêt de pouvoir recevoir directement les cellules et de réaliser l'ensemble des étapes de préparation sans perturber la culture. Nous avons néanmoins rencontré quelques problèmes de répartition des cellules sous forme d'amas, lorsque la quantité de cellules déposées était trop faible par rapport à la surface disponible. Les cellules ont adhéré sur la membrane d'aclar sous forme d'une monocouche homogène. Les propriétés physico-chimiques de l'aclar en font un bon support de culture, avec l'avantage de pouvoir être découpé selon un format sur mesure.

Dans la suite des expérimentations, notre choix s'est porté sur les lamelles de verre, en raison de leur faible coût et de la facilité à les déposer sur une lame de verre au moment de réaliser l'inclusion.

4.1.c Autres points particuliers

Nous avons modifié le tampon servant à préparer la solution fixatrice sans en modifier le pH, toujours ajusté à 7,2. Nous avons testé le milieu de Schneider élément de base du milieu de culture des cellules Ciha-1 ainsi que le tampon phosphate de Sørensen. Nous n'avons pas noté d'effet tampon-dépendant sur la qualité de la fixation.

De plus, l'étape de fixation peut être réalisée, sans incidence notable, soit 45 mn à température ambiante soit 1 h 30 à 4°C.

Par comparaison avec un protocole « conventionnel », nous avons omis le passage en oxyde de propylène en raison de la non-tolérance des plaques de culture plastiques aux solvants. Le premier bain d'imprégnation en résine a été directement préparé dans l'éthanol 100.

Enfin, au moment de l'imprégnation en résine, nous transférons les lamelles de verre dans des piluliers plus larges et en verre. En effet lorsque cette étape est réalisée en plaque P24, la résine fait « ventouse » et rend difficile la récupération des lamelles de verre.

4.2 Protocole retenu pour la préparation des échantillons

La préparation des échantillons pour la microscopie électronique est réalisée en plaque de culture P24, les cellules Ciha-1 adhérant sur des lamelles de verre circulaires déposées au fond des puits. Les spiroplasmés sont laissés en contact avec les cellules pendant 18 h, à 32°C.

Le mode opératoire comporte les étapes suivantes :

- 1 - fixation dans une solution de glutaraldéhyde à 2,5 % préparée dans le milieu de Schneider (pH ajusté à 7,2 par NaOH) : 45 min à température ambiante ;
- 2 - rinçages en tampon phosphate de Sørensen 0,1M pH 7,2: 3 × 10 mn ;
- 3 - post-fixation en deux étapes :
 - a) solution de tétraoxyde d'osmium 1% en tampon phosphate 0,1M pH 7,2: 45 mn à température ambiante.
 - b) solution aqueuse d'acide tannique à 1%: 15 min à température ambiante.
- 4 - déshydratation : éthanol 30 %, 50 %, 70 %, 85 %, 95 % (10 mn chaque), éthanol 100 % technique (4 × 15 mn).
- 5 - imprégnation en résine : éthanol 100% / Epon (Luft, in Glauert, 1975) (v/v) 1^{er} bain, (2/1) : 45 mn, 2^{ème} bain (1/1) : 1 h, 3^{ème} bain (1/2) : 1 h avec couvercle puis une nuit sous sorbonne ventilée.

Inclusion : Après avoir légèrement égoutté l'excédent de résine, les lamelles sont déposées sur une lame de verre, cellules vers le haut, puis des gélules de gélatine remplies de résine, sont retournées sur les échantillons. Le tout est polymérisé 24 h à 60°C. Les gélules sont décollées des lames par léger chauffage à l'aide d'une flamme.

4.3 Résultats

Les cellules Ciha-1 non infectées (**figure 4a**) se caractérisent par de petites extensions cellulaires, plus ou moins conservées par le plan de coupe, mais toujours riches en ribosomes et de densité ribosomique comparable à celle du cytoplasme dans le corps cellulaire.

Les spiroplasmés se distinguent de ces extensions par leur forme et leur densité électronique. Certains ont conservé leur forme hélicoïdale et se trouvent à proximité des cellules d'insecte (**figure 4b**). D'autres présentent des morphologies différentes, ovoïdes ou plus ou moins effilées (**figure 4c et 4e**). À plus fort grossissement, on observe l'établissement de contacts étroits entre les membranes plasmiques bactérienne et cellulaire (**figure 4d et 4f**, flèches), suggérant fortement une adhésion des spiroplasmés à leur cellule hôte.

Au cours de ce travail, deux types principaux de morphologie ont été observés au niveau des spiroplasmés extracellulaires. La forme hélicoïdale semble associée à des bactéries libres, en culture dans le milieu ou en début de contact avec les cellules hôtes ; la forme effilée caractérise des bactéries en contact avec les cellules hôtes. Nous avons retrouvé peu de spiroplasmés ovoïdes internalisés en microscopie électronique comparativement aux observations faites en microscopie confocale (résultats non produits).

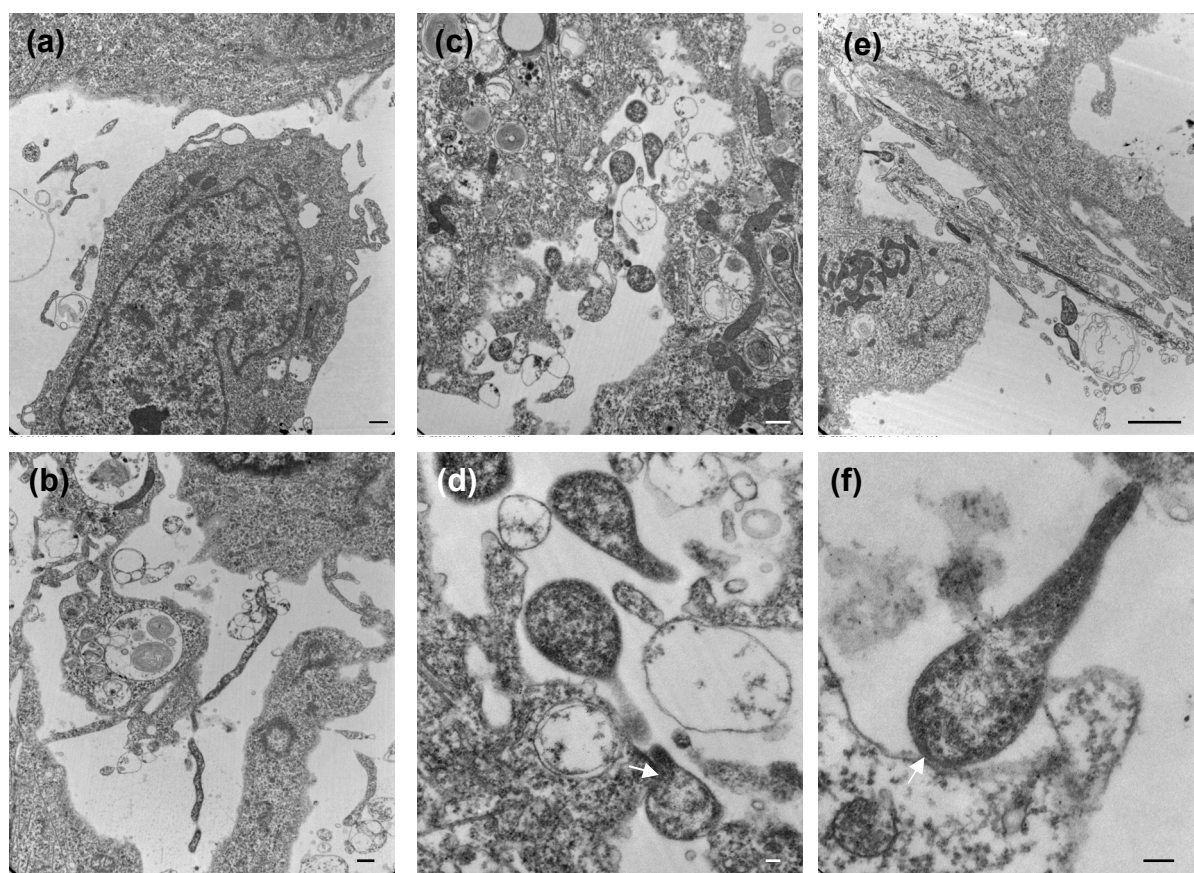


Figure 4 : cellules *Ciha-1* observées en microscopie électronique à transmission, 18h après infection
 (a) Cellule *Ciha-1* non infectée (x 10500) ;
 (b) spiroplasmes extracellulaires à morphologie hélicoidale (x 10500) ;
 (c) vue d'ensemble d'un espace intercellulaire (x 13500) ;
 (d) détail de l'image c, contact membranaire entre un spiroplasma et une cellule (x 46000) ; (e) vue d'ensemble d'un prolongement cellulaire (x 7900) ;
 (f) détail de l'image e, adhésion du spiroplasma à la membrane cellulaire (x 92000)
 Barres d'échelle, 500 nm (a), (b) et (c) ; 100 nm (d) et (f) ; 2 μ m (e)

Discussion

Le modèle *S. citri* / *Ciha-1* représente un modèle d'étude privilégié des interactions mollicutes phytopathogènes / cellules d'insecte hôte (Duret *et al.*, 2009).

La mise en place de l'expérimentation est néanmoins soumise à des contraintes temporelles. L'entretien des cultures cellulaires *Ciha* demande un suivi hebdomadaire. Lors du passage d'un flacon de culture en plaque P24, le délai minimum est de 24 à 48 h pour que les cellules adhèrent et se multiplient correctement sur leur nouveau support de culture ; il est cependant déconseillé de préparer les cellules trop en avance par rapport à la date de leur utilisation. Pour la préparation de l'inoculum *S. citri*, il faut tenir compte du fait qu'une culture ensemencée au 1/10 met de un à quatre jours pour pousser, selon qu'elle est congelée ou déjà entraînée.

La réussite de l'établissement de la mono-couche cellulaire Ciha-1 et celle de l'étape d'infection sont également conditionnées par la maîtrise des dilutions appliquées aux cellules d'insecte et à l'inoculum bactérien. Dans les deux cas, il faut s'adapter aux conditions de croissance des cellules. Les cultures de cellules de *Circulifer* ne doivent pas être trop diluées à chaque passage pour favoriser leur redémarrage, c'est à dire leur adhésion et leur multiplication dans le flacon de culture. Le degré de confluence des cellules est systématiquement vérifié sur un microscope photonique inversé avant de réaliser un passage en plaque P24.

Pour l'inoculum bactérien, les dilutions doivent être ajustées en fonction des souches et de leur capacité de croissance. Une observation en fond noir permet d'évaluer la qualité des suspensions de *S. citri*, en termes de densité, d'hélicité et de motilité.

Les approches par imagerie font partie des outils qui depuis de nombreuses années contribuent à mieux comprendre les mécanismes d'interactions entre microorganismes et cellules hôtes. La microscopie offre un panel de techniques et de modalités d'observation, allant de l'échelle de la microscopie photonique au niveau tissulaire, à celle de la microscopie électronique au niveau cellulaire. Les deux approches, photonique ou électronique, procurent des informations de nature complémentaire, à des échelles et avec une résolution différentes.

Nous avons eu recours dans ce travail aux deux types d'approches, que nous avons utilisé en parallèle sur des échantillons chimiquement fixés pour lesquels la dynamique de l'interaction a donc été figée à un instant « *t* ».

Le principal avantage de la microscopie photonique est de permettre une observation en champ large. On peut ainsi balayer la quasi-totalité de la lame préparée (soit dans notre cas, 1 cm²). On a donc plus de chance de repérer un événement rare (adhésion, pénétration) ou concernant un petit nombre de cellules.

L'approche par immunofluorescence vient en complément d'autres types d'études réalisées en amont, notamment l'étude protéomique de mutants de *S. citri* associée à la caractérisation biochimique des membranes. Cette combinatoire d'approches a permis l'identification de protéines candidates à l'interaction entre *S. citri* et les cellules de *Circulifer haematoceps* et l'immunofluorescence a notamment permis de mettre en évidence une colocalisation entre des spots de PGK (Phospho Glycérate Kinase) et les filaments d'actine. (Labroussaa *et al.*, 2010). Le faible pouvoir de résolution associé à la microscopie photonique représente néanmoins une limite à cette technique. Dans notre cas, le spiroplasma, de 1 à 2 µm de longueur et de 150 à 200 nm de diamètre se trouve à la limite de résolution du microscope confocal, qui, en xy, est de l'ordre de 200 nm.

De plus en microscopie photonique à fluorescence, qu'elle soit conventionnelle ou confocale, seules les molécules immunomarquées sont détectées et il est peu concevable d'utiliser autant de marqueurs que de compartiments cellulaires. Dans ce travail, nous avons utilisé un marquage au DAPI (4',6-diamidino-2-phenylindole, fluorochrome de l'ADN) pour repérer les noyaux des cellules d'insecte et l'image en lumière transmise pour repérer les contours cellulaires.

Le principal intérêt d'une investigation en microscopie électronique est d'apporter les informations manquantes en microscopie photonique à fluorescence, en particulier celles qui concernent l'environnement sub-cellulaire des molécules marquées et leur l'organisation ultrastructurale.

En revanche, la nécessité de réduire la taille de l'échantillon à une surface de coupe d'environ 1 mm² représente un inconvénient majeur. Le champ d'observation en microscopie électronique est 100 fois plus petit que le champ d'observation en microscopie photonique et

l'épaisseur de l'échantillon beaucoup plus faible (50 nm au lieu 10 μm). De plus, le bloc est taillé « en aveugle » entraînant l'élimination de zones d'intérêt. L'échantillonnage doit donc être réalisé avec soin et un grand nombre d'échantillons doivent être observés. Ces raisons expliquent peut-être en partie l'absence, en l'état des observations actuelles, de corrélation entre les observations des monocouches en microscopie confocale et des sections ultra-fines de ces cellules en microscopie électronique, notamment pour la mise en évidence de spiroplasmes internalisés.

Conclusion et perspectives

L'étude des modalités d'interactions entre *S. citri* et les cellules de son insecte vecteur *Circulifer haematoceps* en microscopie confocale et électronique, débouche sur la perspective de pouvoir combiner et corréler, sur un même échantillon, les deux types d'information. La microscopie corrélative ou CLEM (Correlative Light and Electron Microscopy) est par définition l'approche permettant de combiner la microscopie à fluorescence, à basse résolution (200 nm), avec la microscopie électronique, à haute résolution (0,2 nm), afin de combler l'écart entre les deux techniques.

Certaines méthodes corrélatives ont plus particulièrement été adaptées pour les cultures cellulaires, dans le but d'identifier des zones d'intérêt spécifiques en microscopie photonique puis de les relocaliser en microscopie électronique, après inclusion en résine. Leur principe repose sur l'utilisation de supports de culture transparents pour l'observation en fluorescence et munis de repères pour pouvoir tracer les cellules une fois le bloc de résine obtenu. Parmi les supports disponibles, certains sont commercialisés, comme les boîtes de culture à fond quadrillé Mat Tek (www.mattek.com) ou Ibidi (www.ibidi.com). D'autres méthodes sont décrites dans la littérature, en particulier l'empreinte carbone sur membrane d'aclar (Jiménez *et al.*, 2010). Cette méthode consiste à déposer sur l'aclar des grilles de microscopie électronique pourvues de repères alpha-numériques (Finder Grid) puis à métalliser l'ensemble au carbone. Une fois carbonées, les grilles sont retirées du support, laissant leur empreinte sur la membrane.

Lors de notre étude, nous avons dans un premier temps validé l'utilisation de membrane d'aclar comme support de culture pour les cellules Ciha-1. La méthode de l'empreinte carbone devrait donc pouvoir être transférée à notre modèle afin de corréler les données obtenues en fluorescence à celles de la microscopie électronique, et cela à partir de la même culture de cellules de *Circulifer haematoceps* inoculée par *Spiroplasma citri*.

Bibliographie

- Cole R.M., Tully J.G., Popkin T.J., Bové J.M. (1973) Morphology, ultrastructure, and bacteriophage infection of the helical Mycoplasma-Like Organism (*Spiroplasma citri* gen. nov., sp. nov.) cultured from "Stubborn" disease of Citrus, *Journal of Bacteriology*, 115: 367–386
- Duret S., Batailler B., Danet J.L., Béven L., Renaudin J., Arricau-Bouvery N. (2009) Infection of the *Circulifer haematoceps* cell line Ciha-1 by *Spiroplasma citri*: the non-insect transmissible strain 44 is impaired in invasion, *Microbiology* 156: 1097–1107
- Glauert A.M. (1975) Fixation, Dehydration and embedding of biological specimens, *Practical methods in electron microscopy*, volume 3, part I, Elsevier.

- Hogenhout S.A., Oshima K., Ammar E.-D., Kakizawa S., Kingdom H.N., Namba S. (2008) Phytoplasmas: bacteria that manipulate plants and insects, *Molecular Plant Pathology* 9: 403–423
- Jiménez N., Van Donselaar E.G., De Winter D.A.M., Vocking K., Verkleij A.J., Post J.A. (2010) Gridded Aclar: preparation methods and use for correlative light and electron microscopy of cell monolayers, by TEM and FIB-SEM, *Journal of Microscopy*, 237: 208–220
- Labroussaa F., Arricau-Bouvery N., Dubrana M.P., Saillard C. (2010) Entry of *Spiroplasma citri* into *Circulifer haematoceps* cells involves interaction between Spiroplasma Phosphoglycerate Kinase and leafhopper actin, *Applied and Environmental Microbiology* 76: 1879–1886
- Trachtenberg S., Andrews S.B., Leapman R.D. (2003) Mass distribution and spatial organization of the linear bacterial motor of *Spiroplasma citri* R8A2, *Journal of Bacteriology*, 185: 1987-1994
- Tully J.G., Whitecomb R. F, Clark, H. F., Williamson, D. L. (1977) Pathogenic mycoplasmas: Cultivation and vertebrate pathogenicity of a new spiroplasma, *Science* 195: 892-894

Références

www.mattek.com (consulté le 14 décembre 2010)

www.ibidi.com (consulté le 14 décembre 2010)

Voyage au centre du puceron

Observation par microscopie électronique à transmission de particules virales dans le tube digestif et les glandes salivaires accessoires

Catherine Reinbold¹

Résumé : Dans cet article nous livrerons les secrets permettant d'accéder à l'infiniment petit chez le puceron, insecte vecteur de nombreux phytovirus très largement étudiés dans l'équipe Virologie et Vection du centre Inra de Colmar

Nous présenterons trois méthodes d'acquisition du virus par le puceron et la préparation des échantillons en insistant sur l'importance de leur orientation ainsi que des clichés de microscopie électronique à transmission (MET) montrant les phénomènes de transcytose observés dans les épithéliums intestinaux et salivaire.

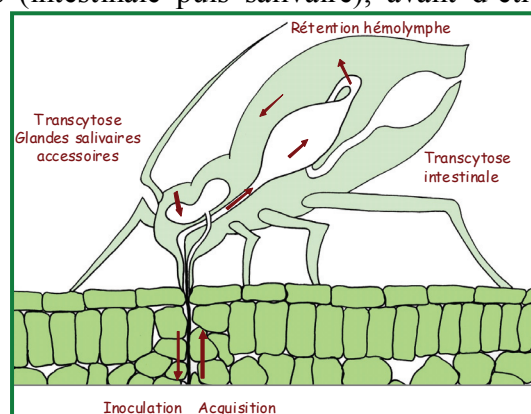
Mots clés : microscopie électronique à transmission, MET, puceron, virus

Introduction

L'équipe Virologie et Vection du centre Inra de Colmar étudie les mécanismes de la transmission des virus de la famille des *Luteoviridae* par puceron. Ces virus, préjudiciables à diverses cultures, sont exclusivement disséminés dans la nature par cet insecte. Comme il n'existe pas de traitement contre les virus, les méthodes de lutte passent par l'emploi massif d'insecticides afin d'éliminer ou de réduire les populations des vecteurs. L'équipe développe des recherches visant à développer des méthodes de lutte qui soient plus respectueuses de l'environnement. Une des approches envisagées est de bloquer la transmission des virus par leur vecteur sans pour autant éliminer les populations d'insectes. L'identification de nouvelles cibles passent par la compréhension fine des mécanismes de transmission.

Les *Luteoviridae* ont la particularité d'être transmis de façon circulante et persistante par le vecteur : les particules virales, icosaédriques et d'un diamètre d'environ 28 nm, sont acquises lors de la prise de nourriture du puceron sur une plante infectée. Elles cheminent dans le corps de l'insecte, traversent deux barrières épithéliales (intestinale puis salivaire), avant d'être injectées à une autre plante lors d'un repas ultérieur (**figure 1**). Compte tenu de leur petite taille, les virus ne peuvent être visualisés que par microscopie électronique à transmission (MET), qui est donc la technique de choix décrite dans cet article, pour observer les virus dans le corps du vecteur.

Figure 1 : circuit des particules virales dans le corps du puceron



¹ UMR 1131 SVQV -Santé de la Vigne et Qualité du Vin - INRA F-68000 Colmar

☎ 03 89 22 49 38 ✉ catherine.reinbold@colmar.inra.fr

Depuis une décennie, l'étude de la transmissibilité de virus modifiés complétée par les résultats de microscopie électronique nous a permis de montrer l'importance des protéines de la capsid du virus dans le processus de transmission (Brault *et al.*, 2007).

Les mécanismes cellulaires conduisant au transport des virus dans les cellules du puceron font appel à des vésicules particulières. Leur ultra-structure est particulièrement bien préservée grâce à la technique proposée par Fred Gildow, Professeur de l'Université de Pennsylvanie (Gildow, 1982, 1987, 1999)

Ce guide du routard du puceron, présenté pour la première fois dans une revue technique, devrait grandement faciliter la vie de l'explorateur aphidien, qui, sans nos conseils avisés, risquerait fort de se perdre dans les sentiers menant aux glandes salivaires accessoires (GSA).

C'est dans cette optique que nous allons vous présenter successivement les trois méthodes d'acquisition du virus par le puceron. Une fois décrites, nous détaillerons la préparation des échantillons pour la MET en insistant sur l'importance de l'orientation des insectes, en particulier des têtes, étape primordiale pour pouvoir repérer les glandes salivaires accessoires. Enfin, nous présenterons des clichés montrant les phénomènes de transcytose observés dans les épithéliums intestinaux et salivaires.

1. Description du matériel et de la méthode

1.1 Elevage des pucerons

Les pucerons sont élevés sur des plantes placées en chambre climatisée à 25°C avec une photopériode 16 h/ 8 h. *Myzus persicae* est élevé sur piment, *Aphis gossypii* sur concombre et *Acyrtosiphum pisum* sur féverole.

1.2 Acquisition du virus

L'acquisition du virus par les pucerons peut être réalisée selon trois protocoles :

- lors de prises alimentaires sur plantes infectées ;
- au travers d'une membrane de parafilm® sur des préparations de virus purifié ;
- par microinjection de virus purifié directement dans la cavité générale de l'insecte.

Ces deux dernières méthodes ont l'avantage d'augmenter considérablement la quantité de virus présente dans l'insecte et donc facilite la visualisation des particules.

1.3 Inclusion des échantillons

Les pucerons, tenus à l'aide d'une pince fine par une patte ou une antenne, sont plongés quelques secondes dans un bécher de 10 ml d'éthanol à 50° puis immédiatement rincés dans de l'eau ultra-pure et placés dans une goutte de fixateur dans une boîte de Pétri. Ils sont coupés en deux au niveau du thorax avec une lame de rasoir sous la loupe binoculaire puis sont placés dans des microtubes de 2 ml. Les échantillons sont ensuite fixés chimiquement, déshydratés dans une série d'acétone (AC) et imprégnés en résine Epon-Araladite (EA) selon le protocole suivant :

Etape	Réactif	Tampon	Durée
Fixation 4°C	Glutaraldéhyde 5 %, Paraformaldéhyde 2 %, CaCl ₂ 0,01%, NaN ₃ 0,05 %	Cacodylate de sodium 0,02M, pH 7,2	20 h
Lavages 4°C		Cacodylate de sodium 0,1M, pH 7,2	3 fois 5 mn
Postfixation 4°C	Tétroxyde d'osmium 1 %	Cacodylate de sodium 0,1M, pH 7,2	1 h, obscurité
Lavages 4°C		Cacodylate de sodium 0,1M, pH 7,2 Eau ultra-pure	1 fois 5 mn 3 fois 5 mn
Postpost fixation 4°C	Acétate d'uranyle 2 %	Eau ultra-pure	1 h, obscurité
Lavage 4°C		Eau ultra-pure	1 fois 5 mn
Déshydratation	Acétone 30 % (AC) 4°C Acétone 50 % 4°C Acétone 70 % 4°C Acétone 95 % 4°C Acétone 100 % <i>T. ambiante</i>		1 fois 30 mn 1 fois 30 mn 1 fois 30 mn 1 fois 30 mn 3 fois 30 mn
Imprégnation <i>T. ambiante</i>	AC 2 vol / EA 1 vol AC 1 vol / EA 1 vol AC 1 vol / EA 2 vol EA pur		3 h (agitation) nuit (agitation) 3 h (agitation) nuit, 8 h, nuit
Polymérisation	EA pur		65°C, 60 hrs

1.3.a Préparation de la résine EA (Epon-Araldite)

Les constituants suivants sont mélangés jusqu'à obtention d'une résine homogène.

Embed-812	25 ml
Araldite 502	15 ml
DDSA	55 ml (dodénylsuccinique anhydre, durcisseur)
DMP-30	2 ml (tridiméthylaminoéthyl phénol, accélérateur)
DBP	2 ml (dibutylphthalate, plastifiant)

1.3.b Orientation des échantillons

Les abdomens sont placés dans des moules d'inclusion plats, pour effectuer des coupes transversales. Pour les têtes, la partie du thorax coupée transversalement est placée au fond du moule en prenant soin d'orienter les antennes du côté où les coupes seront réalisées (coupes frontales) (**figure 2**).

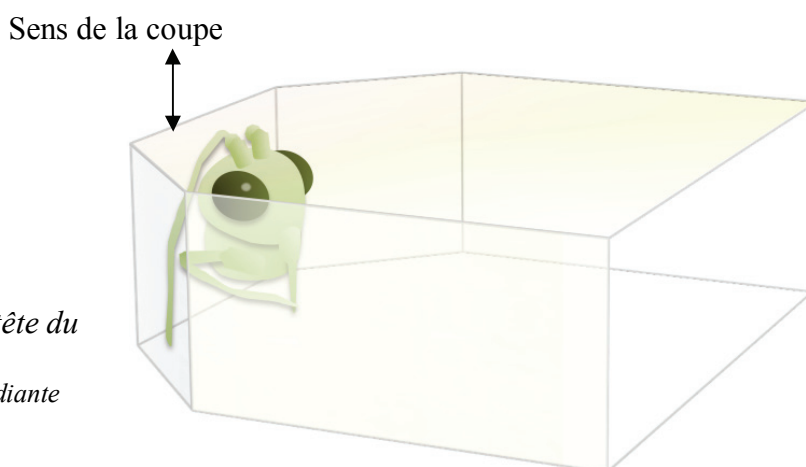


Figure 2 : orientation de la tête du puceron dans la résine
(schéma © Caroline Hemmer, étudiante en thèse à l'Inra)

1.4 Réalisation des coupes semi et ultrafines à l'ultramicrotome.

Les coupes semi fines de 500 nm d'épaisseur sont colorées au bleu Azur B (solution à 0,5 % dans du tampon phosphate 0,1M pH 7). Le bleu laissé en contact quelques secondes avec la lame encore chaude est ensuite éliminé avec de l'eau ultra-pure. Puis les coupes sont observées au microscope optique de façon à repérer les différentes structures internes du puceron.

Au niveau de la tête, il est important de réaliser quelques coupes à main levée de façon à se placer au niveau des yeux, repère essentiel pour localiser les GSA.

Pour les abdomens, le nombre de coupes à la lame de rasoir à réaliser est fonction des structures recherchées : l'estomac étant plus antérieur que l'intestin postérieur.

Puis les blocs sont retaillés de façon à obtenir la plus petite surface de coupe possible contenant les organes d'intérêt.

Les coupes ultrafines de 70 à 80 nm d'épaisseur, sont réalisées au couteau de diamant.

1.5 Contraste de coupes ultra-fines

Les coupes sont contrastées successivement à l'acétate d'uranyle et au citrate de plomb selon le protocole suivant :

Acétate d'uranyle : 900 µl d'acétate d'uranyle à 2 % en solution aqueuse (filtré et conservé à 4°C à l'obscurité) + 100 µl d'alcool isobutylique. Vortex environ 1 mn.

Les grilles sont plongées 30 mn dans la solution contrastante dans des plaques HLA et placées à l'obscurité.

Les grilles sont rincées trois fois à l'eau ultra-pure bouillie dans des béchers de 10 ml et placées dans la boîte de coloration.

Citrate de plomb (CP) : 0,04 g de CP + 100 µl NaOH 10 N + qsp H₂O 10 ml bouillie et tiède dans une fiole jaugée.

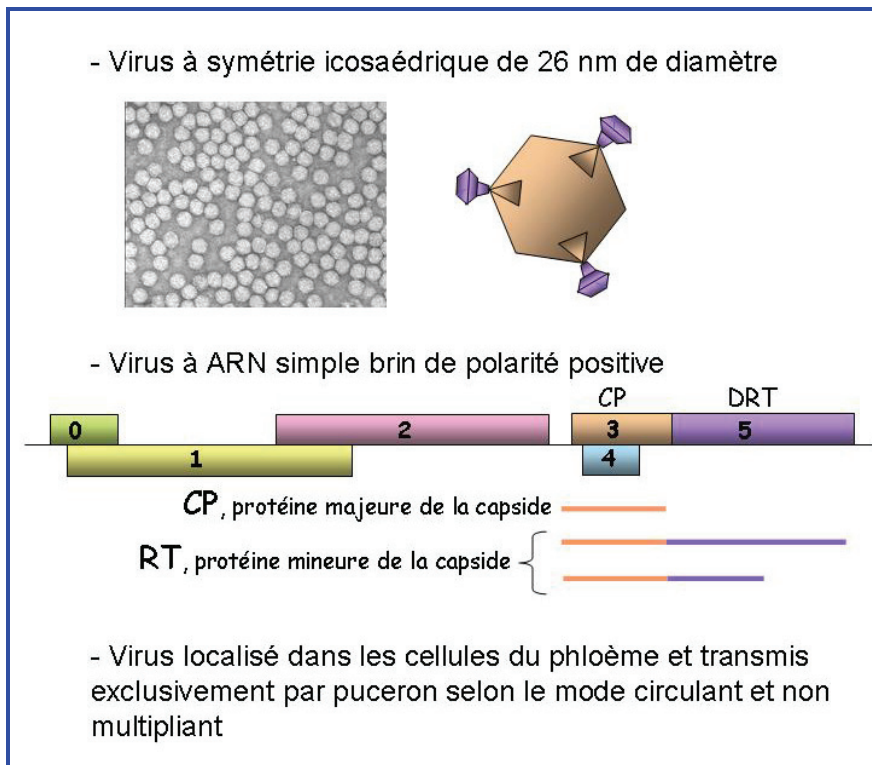
Remplir la boîte de coloration de la solution de citrate de plomb et la placer dans un bécher contenant quelques cristaux de KOH. Sceller avec du parafilm et laisser agir 10 mn.

Rincer d'abord à l'eau ultra-pure bouillie (100 ml + 200 µl de NaOH 10 N) puis deux fois à l'eau pure pendant quelques minutes puis laisser sécher.

2. Résultats

La **figure 3** montre l'emplacement des glandes salivaires au niveau de la tête du puceron.

Un détail observé en MET (**figure 4**) permet de visualiser les canaux salivaires (cs) caractéristiques des GSA. Les virions se trouvant de la cavité générale de l'insecte ou hémocèle (he) doivent par des phénomènes de transcytose rejoindre ces canaux avant d'être relargués dans une plante lors d'un repas ultérieur.



Encadré : *description des polerovirus*

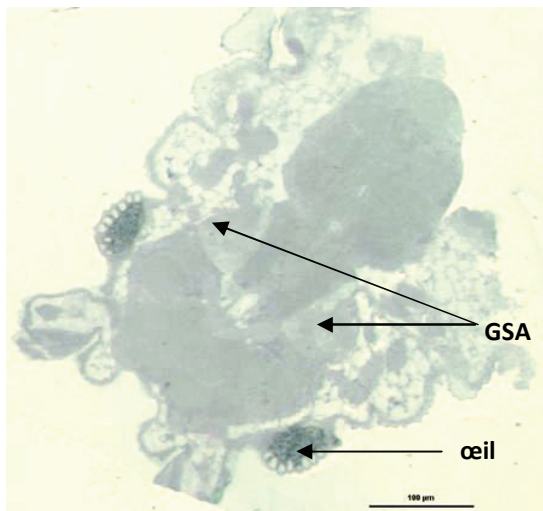


Figure 3 : *coupe frontale de tête de puceron colorée au bleu azur B observée en microscopie optique*

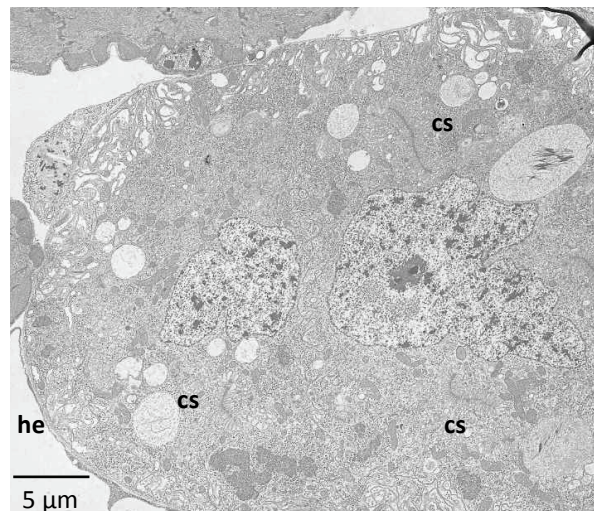


Figure 4 : *coupe de GSA*

Localisation de 2 virus étudiés au laboratoire (TuYV et CABYV) au niveau salivaire (**figure 5A**) et au niveau intestinal (intestin moyen et intestin postérieur) (**figures 5B à 5E**)

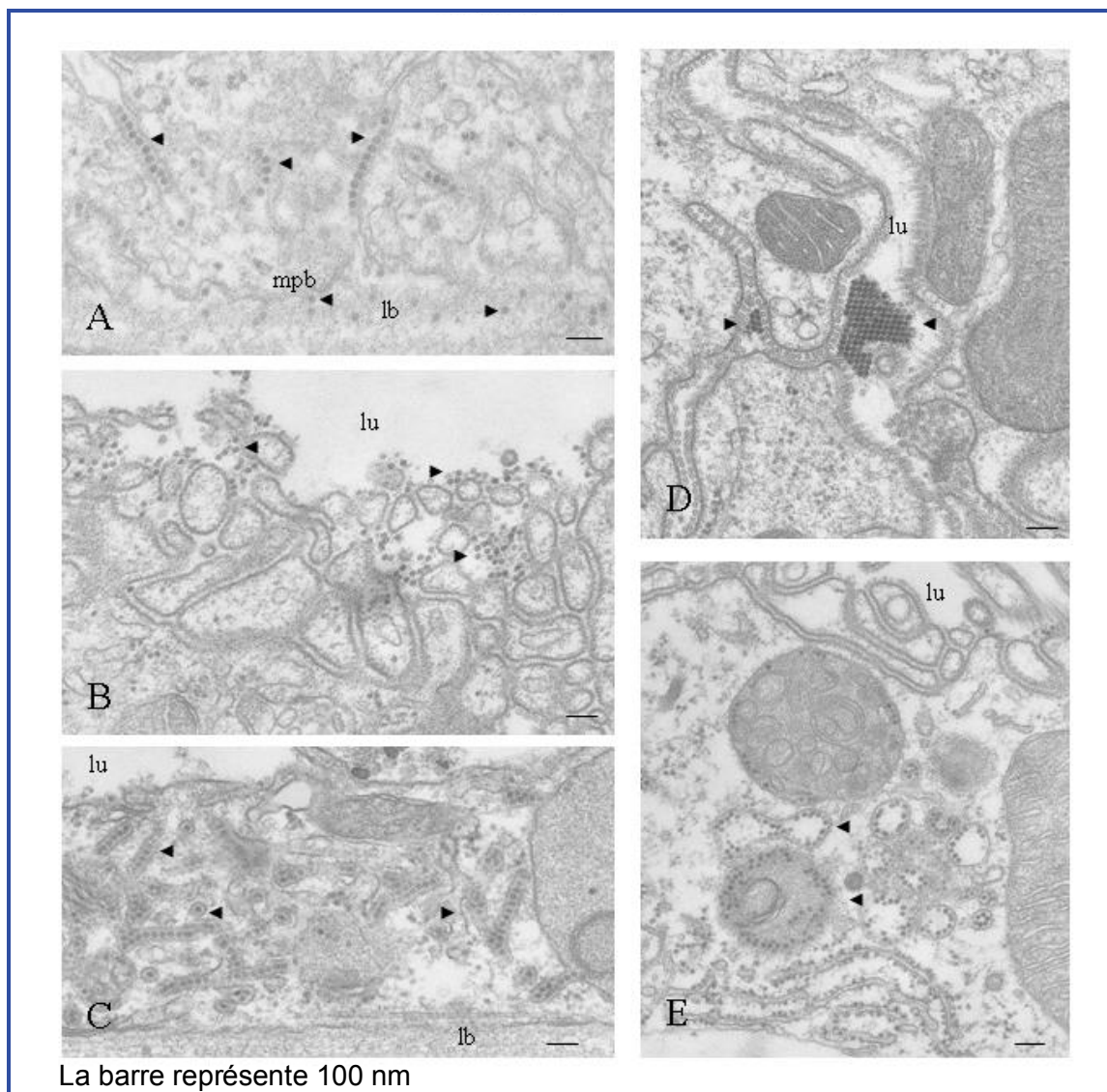


Figure 5 :

A : particules virales de CABYV (introduit dans l'encart) dans la lamelle basale (lb) et des invaginations de la membrane plasmique basale (mpb) de GSA d'Aphis gossypii

B : particules de TuYV (introduit dans l'encadré) dans la lumière (lu) de l'intestin moyen de Myzus persicae

C : vésicules tubulaires contenant des particules de CABYV dans le cytoplasme d'une cellule de l'intestin postérieur de Myzus persicae

D : particules d'un mutant de TuYV regroupées sous forme de cristal dans la lumière de l'intestin postérieur de Myzus persicae

E : différentes vésicules contenant du TuYV dans le cytoplasme d'une cellule de l'intestin moyen de Myzus persicae.

Conclusion et perspectives

La méthode de MET permet l'observation des particules virales dans le corps du puceron vecteur au niveau de l'intestin et des glandes salivaires accessoires. L'acquisition du virus doit être réalisée de préférence au travers d'une membrane ou par micro-injection du virus dans la cavité générale de l'insecte ce qui augmentera les chances de visualiser le virus dans les glandes salivaires accessoires.

Cette méthode est reproductible et adaptable à tout puceron vecteur capable d'acquérir et de transmettre les virus à partir d'une solution de virus purifié. Elle peut être également transposée à d'autres insectes vecteurs de phytovirus comme les cochenilles.

Bibliographie

Brault V., Herrbach E. et Reinbold C. (2007) Electron microscopy studies on luteovirid transmission by aphids. *Micron* 38, 302-312.

Gildow F. E. (1982) Coated vesicle transport of luteovirus through the salivary gland of *Myzus persicae*. *Phytopathology* 72, 1289-1296

Gildow F. E. (1987) Virus membrane interactions involved in circulative transmission of luteoviruses by aphids. *Current topics in Vector Research* 4, 93-120

Gildow F. E. (1999) Luteovirus transmission and mechanisms regulating vector specificity. In *The Luteoviridae*, pp. 88-113. Edited by H. G. Smith & H. Baker. Oxford: CAB International

Quantifier en microscopie

Adaptation d'une méthode de comptage à la caractérisation de différences biologiques

Laure Avoscan ¹

Résumé : *Pour mettre en évidence certains effets structurels de traitements appliqués aux plantes, nous avons mis au point, à l'unité microbiologie du sol et de l'environnement du centre Inra de Dijon, une méthode originale. Cette démarche a été initiée à partir du travail de Leborgne-Castel et al., 2007 pour exploiter des observations d'un effet structurel en réponse à un traitement donné. Notre apport a consisté à compléter cette approche quantitative par une méthode statistique de l'analyse qualitative d'images de microscopie électronique à transmission sur des coupes ultrafines de racines d'Arabidopsis thaliana. Nous avons pu valider cette méthode lors de comparaisons de l'abondance de vésicules dans les cellules de racines d'A. thaliana en présence ou non de fer chélaté à un sidérophore bactérien.*

Mots clés : fer, *Arabidopsis thaliana*, *Pseudomonas fluorescens*, microscopie électronique à transmission, MET, analyse statistique

1. Introduction

Des études en microscopie électronique à transmission (MET) soulèvent la difficulté de la démonstration significative d'un effet biologique sur la base de la collecte d'images à partir des observations d'échantillons. En effet, pour démontrer un effet biologique significatif, la difficulté est de collecter suffisamment d'images pour que les résultats soient statistiquement exploitables. Grâce à l'amélioration des techniques d'acquisition d'images par des caméras numériques associées aux MET, l'acquisition d'un grand nombre d'images ainsi que des mesures simples comme les distances et les surfaces sont facilitées. Malgré ces avancées certaines, nous nous trouvons toujours en MET devant une double difficulté ; la première consiste à élaborer une méthode d'exploitation des observations pour obtenir une représentativité chiffrée de l'effet observé ; la seconde est de pouvoir caractériser significativement de légères différences sur la base d'observations structurelles purement qualitatives.

Notre équipe « dynamique des interactions entre les plantes et les microorganismes » du Centre Inra de Dijon, a travaillé, ces deux dernières années, sur des observations qualitatives en MET de coupes ultrafines de racines de plantes. Les résultats issus de cette étude, purement qualitative, montraient une différence d'abondance de vésicules apoplasmiques dans des cellules racinaires, en présence ou non de fer chélaté à un sidérophore bactérien. Les différences observées nécessitaient néanmoins une validation quantitative et une étude statistique. Sans cette validation statistique, nous ne pouvions conclure quant aux observations réalisées à ce stade de l'étude.

¹ UMR1229 MSE - Microbiologie du Sol et de l'Environnement - INRA - F-21065 Dijon cedex

☎ 03 80 69 35 72 ✉ laure.avoscan@dijon.inra.fr

Nous nous sommes donc basés sur le travail de Leborgne-Castel *et al.*, 2007 qui ont quantifié leurs observations d'invaginations plasmalemmiques de clathrine (avant la libération des vésicules à clathrine dans le cytosol) dans des cellules isolées de tabac. Dans leur étude, ces structures sur la membrane plasmique sont quantifiées et rapportées au nombre de structures pour 100 μm de périmètre de membrane plasmique. Pour chaque échantillon sectionné, 20 à 30 sections de cellules ont été observées. Ces auteurs ont, par ailleurs, réparti en trois classes les observations : la première classe comporte l'absence d'invagination, la deuxième classe regroupe une observation d'invagination et la troisième classe regroupe deux ou plus d'invaginations pour 100 μm de membrane plasmique. Dans notre étude, pour comptabiliser et pour établir un groupement en classes sur l'observation de tissus racinaires et non de cellules isolées, nous avons apporté des adaptations. Ces adaptations consistaient à comptabiliser les observations de vésicules apoplasmiques pour un μm de membrane plasmique et à réaliser le classement selon des classes basées sur le nombre de vésicules apoplasmiques par μm de membrane plasmique de cellules racinaires. Pour valoriser les résultats numériques, nous avons comparé les distributions de fréquence obtenues des observations dans chacune des classes ainsi définies à l'aide d'un test statistique non-paramétrique. Nous décrivons ici les adaptations et modifications apportées à cette méthode.

2. Description de la méthode et d'un exemple d'application

2.1 Préparation du matériel biologique

La première étape (**figure 1.1**) consiste à préparer le matériel biologique selon la procédure choisie pour les observations d'ultra-structure en microscopie électronique.

2.2 Acquisition des images

La seconde étape (**figure 1.2**) correspond à l'observation des coupes et l'acquisition des images de l'effet biologique observé. Dans l'exemple présenté en **figure 1**, deux traitements sont comparés. L'acquisition des images est réalisée, pour chaque traitement, sur au moins 3 échantillons fixés c'est-à-dire 3 blocs coupés ; 30 à 50 cellules sont observées à partir de ces coupes.

2.3 Calibration des observations

La troisième étape (Figure 1.3) exploite les images acquises pour quantifier l'effet biologique observé c'est-à-dire dans notre exemple, dénombrer le nombre de vésicules apoplasmiques pour chaque traitement testé. Pour cela, les observations sont normalisées en comptant les vésicules apoplasmiques pour 1 μm de membrane plasmique. Cette calibration est nécessaire pour comparer les différentes observations de chaque traitement car les cellules observées n'ont pas toute la même taille. Le nombre d'observations de vésicules apoplasmiques par μm de membrane plasmique est présenté dans des graphiques en **figure 1.3**.

2.4 Distribution des observations

La quatrième étape (**figure 1.4**) permet de grouper les observations dans des classes afin de différencier statistiquement les distributions obtenues. L'intervalle de chaque classe est déterminé à partir de ces graphiques ; nous avons fait le choix de regrouper en classe 0, le nombre d'observations pour une à deux vésicules apoplasmiques par μm de membrane plasmique, en classe 1, le nombre d'observations pour trois à six vésicules apoplasmiques par μm de membrane plasmique et en classe 2, le nombre d'observations équivalent ou supérieur

à sept vésicules apoplasmiques par μm de membrane plasmique. Il en résulte une distribution de classes par traitement étudié.

2.5 Analyse statistique

La cinquième étape (**figure 1.5**) compare la signification des différences entre deux distributions à l'aide du test du chi carré (X^2). Dans notre exemple, la distribution du nombre d'observations de vésicules apoplasmiques du traitement 1 est-elle différente de celle du traitement 2 ? Le test du chi carré est conduit en posant :

- l'hypothèse nulle H_0 signifie que les distributions sont indépendantes du traitement, c'est-à-dire que la répartition du nombre de vésicules apoplasmiques ne dépend pas du traitement,
- l'hypothèse alternative H_1 signifie que les distributions sont dépendantes du traitement, c'est-à-dire que la répartition du nombre de vésicules apoplasmiques est corrélée au traitement de la plante.

Le tableau de contingence **5a de la figure 1.5** présente les données observées et quantifiées c'est-à-dire le nombre d'observations par classe et par traitement, la somme des observations par traitement, et la somme des observations par classe. Les valeurs théoriques présentées dans le tableau **5b de la Figure 1.5** sont calculées à partir de ces données observées selon la formule suivante :

$$\text{Valeur théorique} = \frac{\text{total des observations en colonne (classe)} \times \text{total des observations en ligne (traitement)}}{\text{nombre total des observations}}$$

Enfin, le tableau 5c présente les valeurs détaillées chi carré calculées et obtenues à l'aide de la formule suivante :

$$X^2 \text{ d'une donnée} = \frac{(\text{valeur observée} - \text{valeur théorique})^2}{\text{valeur théorique}}$$

La somme de ces valeurs, relatives à chaque cellule, permet de calculer le X^2 des données qui est de 108,18. 108,18 correspond à une mesure de l'écart existant entre les effectifs théoriques attendus et ceux observés dans l'échantillon. Cette valeur est alors comparée au X^2 théorique, obtenue dans la table du X^2 , pour un pourcentage de risque α que l'on définit et un degré de liberté (ddl) calculé comme suit :

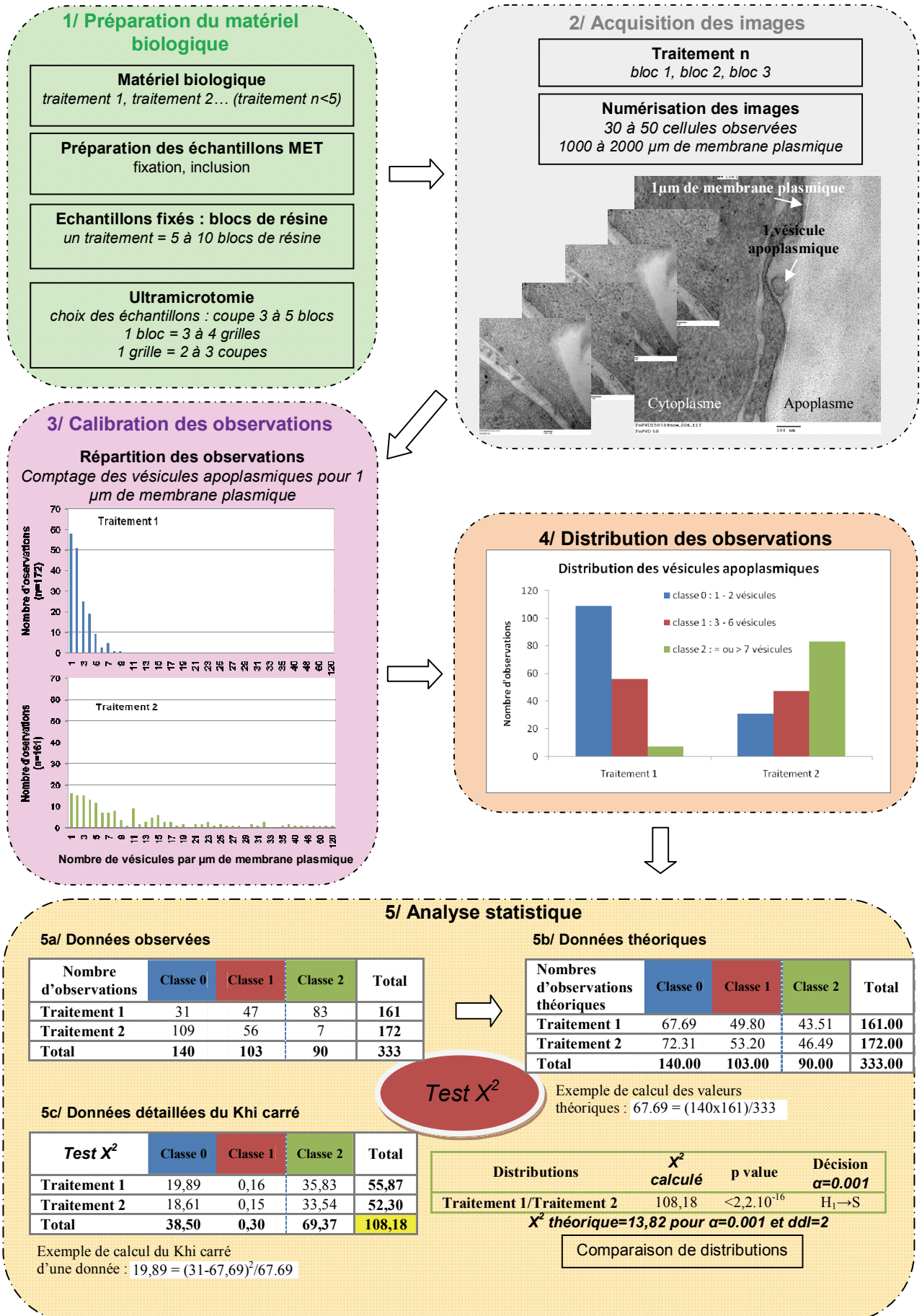
Si on se donne un risque α de 0,001% de chance de se tromper, la valeur du χ^2 théorique pour un ddl de 2 est 13,82. Or la valeur du χ^2 calculée de 108,18 est nettement supérieure à la valeur théorique, cela signifie que l'hypothèse H_0 est rejetée pour la comparaison des

$$\text{ddl} = (\text{nombre de ligne} - 1) \times (\text{nombre de colonnes} - 1)$$

soit dans notre exemple,

$$\text{ddl} = (2 - 1) \times (3 - 1) = 1 \times 2 = 2$$

distributions avec un risque de 0,001% de chance de se tromper. Ces distributions diffèrent significativement entre elles, l'hypothèse alternative H_1 est vraie, c'est-à-dire que dans notre exemple, la répartition du nombre de vésicules apoplasmiques est corrélée au traitement de la plante.



Conclusion

Nous avons mis au point et expérimenté une approche quantitative et statistique d'exploitation d'images en microscopie électronique à transmission, lors de la comparaison de l'abondance de vésicules dans les cellules de racines d'*A. thaliana* en présence ou non de fer chélaté à un sidérophore bactérien. Cette approche quantitative est actuellement appliquée pour comparer l'effet biologique du sidérophore, en l'absence et en présence de fer, qu'il soit chélaté ou non au sidérophore bactérien, au niveau cellulaire des racines d'*A. thaliana* sur le nombre de vésicules apoplasmiques observées en microscopie électronique à transmission. Cette méthode peut-être applicable sur d'autres modèles biologiques ; toutefois, nous recommandons d'éviter de multiplier les conditions de traitements puisque l'acquisition de nombreuses images est nécessaire pour un échantillon ou traitement donné.

Remerciements : Nous remercions Nathalie Leborgne-castel et Jeannine Lherminier pour leurs conseils techniques au cours de l'exploitation des résultats ainsi que Sylvie Mazurier pour son aide dans l'exploitation statistique des données.

Bibliographie

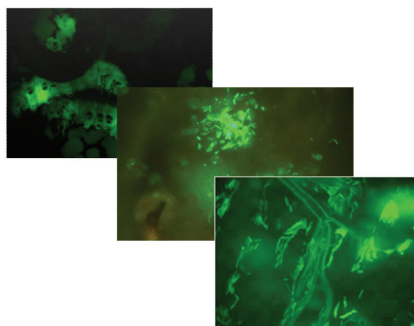
Leborgne-Castel N., Lherminier J., Der C., Fromentin J., Houot V., Simon-Plas F. (2008) The plant defense elicitor cryptogein stimulates clathrin-mediated endocytosis correlated with reactive oxygen species production in Bright Yellow-2 Tobacco cells. *Plant Physiology* 146:1255-1266.

Le Cahier des Techniques de l'Inra



Microscopie
et interactions

hôtes / micro organismes



Délégation au Partenariat avec les Entreprises
Institut national de la recherche agronomique - 147 rue de l'Université - F-75338 Paris Cedex 07

Numéro spécial

Année 2011

Microscopie et interactions hôtes/micro-organismes

Sommaire

01 - La fluorescence : solution pour exploiter les résultats d'expression de gènes bactériens dans une larve d'insecte infecté, *Sylvie Pagès, Anne Lanois, Nadège Ginibre*

02 - Localisation et visualisation de transcrits fongiques *in situ* : une méthode originale qui combine biologie moléculaire et microscopie confocale, *Christine Arnould, Marie Tollot, Pascale Seddas, Vivienne Gianinazzi-Pearson*

03 - Évaluation de la fluidité de la membrane plasmique avec la sonde fluorescente di-4-ANEPPDHQ : adaptation de la technique de recouvrement de fluorescence après photoblanchiment (FRAP) sur cellules végétales en suspension, *Christophe Der*

04 - Apport de l'imagerie cellulaire à l'étude des interactions entre la bactérie intra-phloémique *Spiroplasma citri* et les cellules de son insecte vecteur *Circulifer haematocaps*, *Brigitte Batailler et Nathalie Arricau-Bouvery*

05 - Voyage au centre du puceron : Observation par microscopie électronique à transmission de particules virales dans le tube digestif et les glandes salivaires accessoires, *Catherine Reinbold*

06 - Quantifier en microscopie : Adaptation d'une méthode de comptage à la caractérisation de différences biologiques, *Laure Avoscan*