

Evaluation de la virulence de bactéries entomopathogènes.

Mise en place au laboratoire d'un bio essai reproductible
en conditions contrôlées

Sylvie Pagès, Nadège Ginibre¹

La méthodologie utilisée en routine au sein de notre laboratoire est un bio essai permettant d'évaluer la pathologie des bactéries entomopathogènes. Ce test est effectué en conditions contrôlées par injection de suspension bactérienne en phase exponentielle de croissance à des larves d'insectes.

Dans ce travail nous proposons une procédure de test pathologique sur l'espèce de lépidoptère *Spodoptera littoralis* en testant les bactéries entomopathogènes *Xenorhabdus* et *Photorhabdus*. Cette méthode est également applicable à tout autre agent pathogène.

Mots clés : Insectes, bactéries entomopathogènes, *Xenorhabdus*, *Photorhabdus*, courbes de survie, logiciel SPSS.

1. Introduction

Le choix de *Spodoptera littoralis* comme insecte modèle en laboratoire de pathologie pour les essais par injection se justifie pour plusieurs raisons. L'espèce est polyphage et elle provoque des dégâts importants dans tout le Bassin méditerranéen. Cette noctuelle attaque les productions horticoles (tomate, piment,...) et floricoles, ainsi que les cultures industrielles (coton, maïs). De plus, *Spodoptera* (<http://www.inra.fr/Internet/Produits/HYPPZ/especes.htm>) est un insecte facile à maintenir en élevage sur milieu artificiel.

La « Dose Létale qui tue 50% de la population » (DL50) chez les Lépidoptères est souvent inférieure à 20 cellules bactériennes pour *Xenorhabdus* et *Photorhabdus*. Ces bactéries représentent donc un excellent modèle pour l'étude des interactions bactéries-insectes.

En dehors de l'insecte, *Xenorhabdus* (<http://www.bacterio.cict.fr/xz/xenorhabdus.html>) et *Photorhabdus* (<http://www.bacterio.cict.fr/p/photorhabdus.html>), bactéries de la famille des *Enterobacteriaceae*, se trouvent dans l'intestin des nématodes respectivement *Steinernema* et *Heterorhabditis* (Némathelminthes ou vers ronds), présents dans les sols. Ces nématodes parasitent le milieu intérieur des larves d'insecte et par conséquent y introduisent leurs bactéries (Sicard et al. 2004).

Les injections de cultures pures de *Xenorhabdus* et *Photorhabdus* (sans nématodes), ont montré le fort pouvoir pathogène de ces bactéries sur les larves de *Spodoptera littoralis* ainsi que sur différents ordres d'insectes (Coléoptères, Diptères). Ces bactéries se multiplient dans l'hémolymphe entraînant une septicémie létale pour la larve d'insecte. On peut donc étudier séparément la pathologie engendrée par ces seules bactéries sans l'appui de leur nématode hôte.

¹ Unité EMIP Ecologie Microbienne et Interactions hôtes Pathogènes
UMR 1133, INRA - Université Montpellier II Place E. Bataillon CC54 34095 MONTPELLIER Cedex 05
Courriel : pagess@ensam.inra.fr

2. Matériels et méthodes

2.1. Préparation des larves d'insectes

Spodoptera littoralis possède 5 stades de développement larvaire (L1, L2, L3, L4 et L5) avant sa transformation en chrysalide. Le passage d'un stade à un autre se caractérise par la perte de la cuticule (exuviation) laissant place à celle du stade suivant, marquée par le changement de couleur du blanc au noir, lié à la mélanisation. Dans ce protocole expérimental, nous utilisons le stade L5. La veille de l'expérimentation, nous isolons des larves datées de 14 jours après l'éclosion des œufs, élevées à 23°C. Elles sont à la fin du stade larvaire L4, reconnaissables par un liseré blanc au dessus de la capsule céphalique. Le jour de l'expérimentation, les larves triées sont au début du stade L5, elles ont achevé la mue, matérialisée par une cuticule et une capsule céphalique noires. La capsule est d'une taille supérieure à celle du stade précédent, le liseré blanc a disparu.

La sélection des larves au stade L5 permet d'homogénéiser et de standardiser les essais de pathogénicité par injection parce qu'elles ont toutes le même âge dans le stade. La durée du stade larvaire L5 est de 5 jours, contrairement aux autres stades larvaires plus courts. Cette durée permet de suivre le test de mortalité sans l'influence d'un changement de stade larvaire. La manipulation des larves est facilitée grâce à la taille de la larve L5 (**photo 1**).

Chaque essai comprend un échantillon de vingt larves (nombre suffisant à l'obtention d'un test reproductible). Les larves sont nourries avec un milieu artificiel mis au point à l'INRA par Poitout et *al.* (1970). Elles sont placées dans une boîte plastique à couvercle grillagé déposée dans une enceinte thermostatée à 23°C disposant d'un système d'éclairage jour/nuit contrôlant une photo périodicité L16 : D8 (16 heures de jour et 8 heures de nuit).



Photo 1 : *Spodoptera littoralis* au stade larvaire L5
15 à 16 jours après l'éclosion des œufs.

Point d'injection entre la deuxième et troisième paire de fausses pattes

2.2. Préparation de l'inoculum bactérien

Les bactéries sont cultivées sur milieu solide NBTA (Akhurst 1980) puis incubées à 28°C pendant 48h. Ce milieu de culture est propre à la caractérisation des *Xenorhabdus* et *Photorhabdus*. La suspension bactérienne est préparée dans un bouillon Luria Bertani à partir de 2 à 3 colonies prélevées sur milieu NBTA. Elle est placée à 28°C pendant 20 heures en agitation (600 rpm). Cent microlitres de cette pré culture servent à ensemencer un nouveau bouillon Luria Bertani. Celui-ci est incubé à 28°C sous agitation (600 rpm) pendant 3 à 4 heures jusqu'à l'obtention d'une culture en phase exponentielle de croissance ($DO_{540\text{ nm}}$ de 0.8).

Cette culture est lavée dans du tampon PBS sans $CaCl_2$ $MgCl_2$ (Gibco) afin de limiter les agrégats bactériens puis centrifugée (5 min à 13000 rpm/min). Un millilitre de culture lavée

est dilué en série de 10 en 10 dans le tampon PBS. Un comptage des bactéries à la cellule hématimètre de Thoma <http://documentation.ledamed.org/IMG/html/doc-10891.html> permet d'estimer le nombre de bactéries par ml de la culture bactérienne. Grâce à cette estimation nous calculons la dilution bactérienne à utiliser qui permet d'injecter dans l'hémolymphe² de *Spodoptera littoralis* environ 10^3 bactéries pour *Photorhabdus*, et 10^2 bactéries pour *Xenorhabdus* dans un volume de 20 μ l.

La concentration en Unités Formant Colonie (UFC) est déterminée par comptage visuel des colonies, après étalement de la dilution à 10^{-5} sur gélose nutritive ordinaire (Difco) et incubation à 28°C pendant 48h.

2.3. Injection

L'injection se fait entre la deuxième et troisième paire de fausses pattes dans la partie latérale de l'abdomen de la larve (**photo 1**) préalablement désinfectée à l'alcool à 70°. Le piston du micro-injecteur (**photo 2**) entraîne à chaque tour du vernier l'injection de 10 μ l de la culture bactérienne, 2 rotations sont nécessaires pour injecter 20 μ l.

Un lot de 20 larves préalablement sélectionnées au stade larvaire L5 est injecté et chaque larve est placée individuellement dans une boîte compartimentée afin d'éviter le cannibalisme. En parallèle, et dans les mêmes conditions opératoires nous injectons 20 μ l de tampon PBS à un lot de 10 larves qui nous sert de témoin négatif. Un cm^3 environ de milieu artificiel est ajouté dans chaque compartiment et il sera renouvelé quotidiennement au cours de l'expérimentation (4 à 5 jours maximum).



Photo 2 : *Micro-injecteur et boîte compartimentée contenant un cm^3 de milieu artificiel où sont placées les larves après injection*

2.4. Incubation, lecture

Les boîtes contenant les lots essais et le lot témoin sont placées dans un environnement contrôlé (23°C ; L16 : D8). Durant les premières heures après l'injection nous contrôlons notamment l'appétence, le comportement, comme signes précurseurs de pathogénicité. En fonction de la dose de bactéries injectée, de la souche bactérienne testée, les premières larves mortes peuvent apparaître 20 heures après l'injection. Dès lors nous recensons le nombre de larves mortes toutes les heures. Le lot témoin négatif est contrôlé simultanément.

² Hémolymphe = sang des insectes

Au-delà de 5 jours après l'injection, les mortalités ne sont plus prises en compte. En effet, un changement physiologique important de la larve va s'opérer, lié à la transformation en chrysalide, ses défenses immunitaires en sont modifiées. Après 5 jours, l'hétérogénéité des lots montre que les insectes répondent différemment à des facteurs qui ne sont plus liés directement à l'injection bactérienne.

2.5. Contrôles après injection

Par piqûre au travers de la cuticule de la larve d'insecte avec une aiguille à insuline, il est facile de récolter une goutte d'hémolymphe. Cette goutte estensemencée sur milieu NBTA. Après 48 heures de culture à 28°C, des colonies bactériennes apparaissent. Les contrôles phénotypiques relatifs aux bactéries injectées sont réalisés afin de s'assurer que la bactérie injectée est la seule responsable de la septicémie et de la mort de l'insecte. Il est important de contrôler la stabilité de certains caractères phénotypiques et génétiques après passage dans l'insecte. En effet l'apparition de variants ou la perte de plasmide, par exemple, peut être à l'origine de modifications des propriétés phénotypiques et de la pathogénicité.

S'il n'y a pas de colonies bactériennes sur milieu NBTA, la souche bactérienne injectée ne s'est pas multipliée dans l'hémolymphe de l'insecte et n'a pas provoqué la mortalité des larves d'insectes.

2.6. Traitement statistique utilisé

1.7.a. Principe

Les mortalités sont analysées statistiquement à l'aide du logiciel SPSS (*Statistical Package for the Social Science* version 11.0.1) par une analyse de survie de Kaplan-Meier. Cette méthode statistique non paramétrique est empruntée à l'épidémiologie (Rehrig et al. 2001) et est adaptée aux échantillons de petite taille. L'information contenue dans un échantillon est décrite en une courbe appelée courbe de survie, elle est construite en marche d'escaliers. A chaque temps où survient un ou plusieurs décès, la courbe descend d'un cran. Pour chaque intervalle de temps, la probabilité cumulée est constante. La courbe de survie résume l'évolution dans le temps d'un échantillon de larves après l'injection de bactéries avec un intervalle de confiance fixé à 95%.

La problématique est : comment comparer statistiquement 2 courbes ?

Dans cette analyse de survie nous avons utilisé le test du Log-rang qui est un test non paramétrique adapté à la comparaison de l'égalité des distributions des courbes de survie. Tous les points temporels sont pondérés de façon égale dans ce test et la période de survie est découpée en intervalles dont les bornes sont les moments où la mortalité se produit. Il permet de tester si les fonctions de survie correspondent à deux traitements dans une période de temps défini. Il démontre que les fonctions de survie correspondant à deux traitements dans une période de temps défini, sont statistiquement différentes. On choisit $\alpha = 0.05$.

Si $\alpha > 0.05$, alors, la différence n'est pas significative.

Si $\alpha < 0.05$, la différence est significative et α mesure le degré de signification.

(Analyse statistique des données de survie INSERM -Flammarion 1990)

On formule des hypothèses que l'on va vérifier :

Existe-t-il un effet dose de bactéries injectées ?

Existe-t-il un effet manipulation ?

Existe-t-il un effet lié uniquement à la bactérie injectée ?

Ces variables susceptibles d'être liées à la survie sont prises en compte et l'analyse se décompose en 3 étapes distinctes :

- la dose est une variable directement liée au taux de mortalité. Il faut s'assurer que les courbes de survie ne sont pas statistiquement différentes et donc cumulables entre elles pour une dose définie relative à la nature du micro-organisme ;
- il faut vérifier l'effet manipulation c'est-à-dire que les courbes de survie répétées 3 fois minimum pour une même dose injectée ne sont pas statistiquement différentes ;
- si, et seulement si, les deux conditions sont vérifiées alors nous pouvons comparer les données de survie relatives à deux microorganismes.

1.7.b. Préparation des données

Les données sont enregistrées dans de nouveaux tableaux Excel comprenant 3 colonnes :

- temps post injection,
- évènement : enregistrement des mortalités et des survies
- variable susceptible d'être liée à la survie : la dose, la manipulation et la bactérie injectée.

L'évènement correspond à la mort d'un individu au sein de l'échantillon de 20 larves. A chaque évènement, on associe le chiffre 1 correspondant à un temps post injection. Les survivants sont notés 0.

Dans la 3^{ème} colonne nous ajoutons la variable à analyser.

Ainsi la base de données au format.xls est capturée dans le logiciel SPSS.

3. Résultats et interprétation

3.1. Validation des conditions expérimentales

Le lot d'insectes témoins valide l'essai s'il ne présente aucune mortalité ; les larves grossissent normalement jusqu'à la formation d'une chrysalide au bout de 5 à 6 jours.

Les résultats de mortalité de l'essai sont saisis dans un tableau (logiciel Excel). Trois expériences indépendantes sont réalisées. Des représentations graphiques (**figures 1 et 3**) montrent le pourcentage de mortalité en fonction du temps. Ainsi, nous déterminons le critère « Temps Létal qui tue 50% de la population » (TL50) comme l'abscisse correspondant à l'ordonnée 50% pour chacune des doses de bactéries injectées.

Pour une dose supérieure à 10^5 cellules bactériennes chez la larve, la souche bactérienne utilisée est considérée comme non pathogène chez l'insecte (Bucher 1960).

Les résultats obtenus lors de différentes expériences d'injections d'une culture bactérienne en phase stationnaire de croissance pour les souches de *Photorhabdus* nous montrent des différences de TL50 par rapport à ceux obtenus à partir d'une culture en phase exponentielle (**figure 1**). Ces deux conditions expérimentales sont analysées indépendamment par un traitement statistique (**figures 2A et 2B**). Dans chaque condition trois courbes sont comparées. Les cultures bactériennes utilisées en phase exponentielle de croissance montrent des résultats qui ne sont pas statistiquement différents entre eux (**figure 2A**). Aussi, cette condition sera utilisée pour évaluer la virulence des bactéries du genre *Xenorhabdus* et *Photorhabdus* par injection sur des larves de *Spodoptera littoralis*.

La dose de bactéries injectées est un paramètre important à déterminer car elle fait varier le critère TL50 (**figure 3**). L'exemple choisi montre que les doses inférieures à 10^2 cellules bactériennes (**figure 4A**) ne donnent pas de résultats reproductibles dans les 3 expériences contrairement aux doses comprises entre 100 et 250 cellules bactériennes (**figure 4B**). Aussi

cette dose pour les souches de *Xenorhabdus* qui permet une bonne reproductibilité dans nos essais a ainsi été retenue. Pour les souches de *Photorhabdus*, la dose fixée est de 10^3 cellules bactériennes injectées (résultats non montrés).

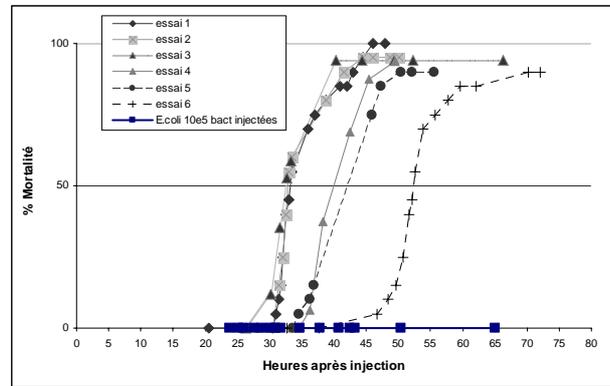


Figure 1 : évolution de la mortalité des larves d’insectes en fonction du temps après injection de *Photorhabdus* en phase de croissance exponentielle (essais 1, 2 et 3) et en phase de croissance stationnaire (essais 4, 5 et 6).
Témoin négatif : injection de 10^5 cellules bactériennes d’une culture de *Escherichia coli* en phase exponentielle de croissance

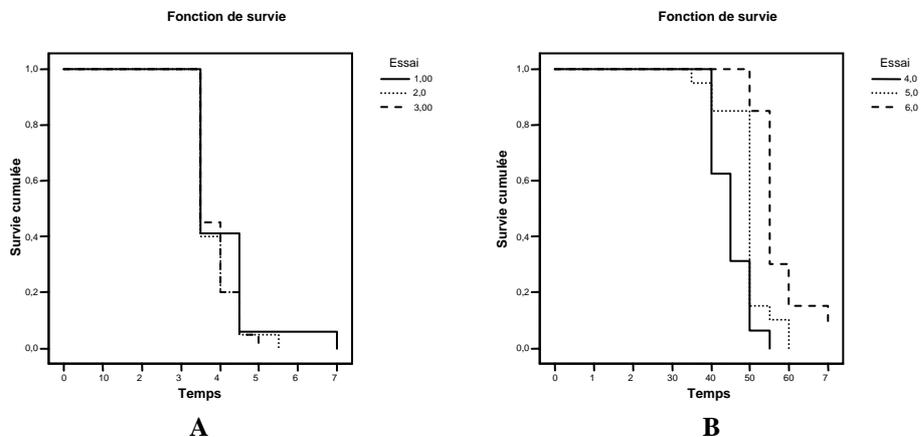


Figure 2A : courbes de survie après injection de bactéries en phase de croissance exponentielle (essais 1, 2 et 3) analysées avec le logiciel SPSS. Les fonctions de survie ne sont pas statistiquement différentes $p = 0.9405$.

Figure 2B : courbes de survie après injection de bactéries en phase de croissance stationnaire (essais 4, 5 et 6) analysées avec le logiciel SPSS. Les fonctions de survie sont statistiquement différentes $p < 0.05$.

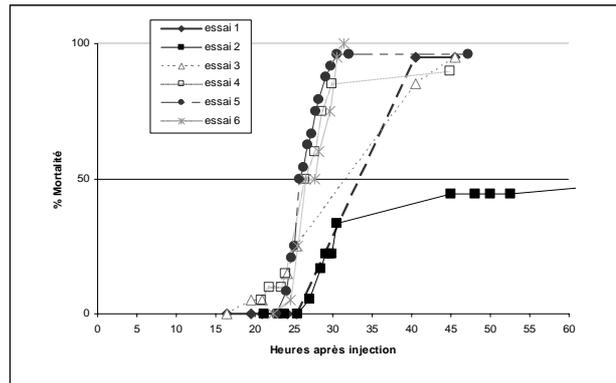


Figure 3 : doses de *Xenorhabdus* injectées aux larves de *Spodoptera littoralis* montrant une différence de TL50
Essais 1, 2 et 3 avec respectivement 20, 24 et 45 cellules bactériennes injectées
Essais 4, 5 et 6 avec respectivement 144, 207 et 215 cellules bactériennes injectées.

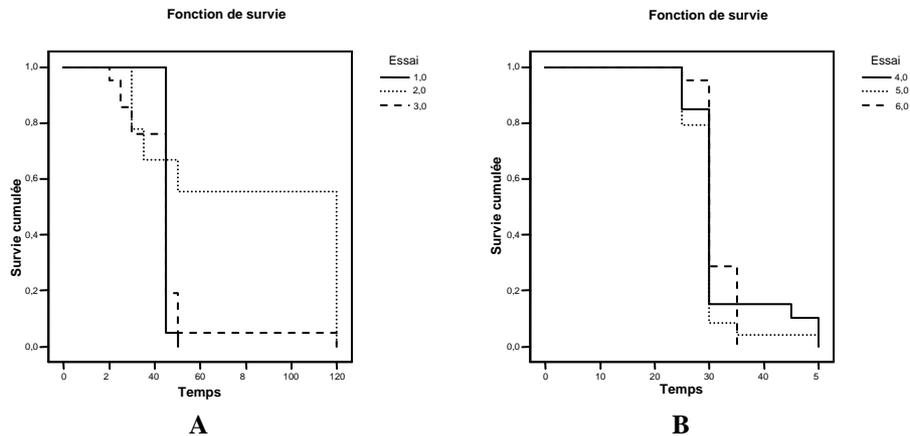


Figure 4A : analyse statistique des essais 1, 2 et 3 respectivement 20, 24 et 45 cellules bactériennes injectées en phase exponentielle de croissance. Les fonctions de survie sont statistiquement différentes $p < 0.05$.

Figure 4B : analyse statistique des essais 4, 5 et 6 respectivement 144, 207 et 215 cellules bactériennes injectées en phase exponentielle de croissance. Les fonctions de survie ne sont pas statistiquement différentes $p = 0.1682$

3.2. Exemples de résultats obtenus

Ce protocole et l'analyse statistique présentés dans cet article ont déjà permis d'analyser la pathologie de différentes souches bactériennes. Par exemple, les tests de pathologie par injection utilisant le mutant *phlA* de *Photorhabdus luminescens* et la souche sauvage montrent que ce gène *PhlA* codant pour une hémolysine n'est pas impliqué dans la virulence bactérienne chez *Spodoptera littoralis* (Brillard et al. 2002).

L'injection de bactéries contenant un gène codant pour la *Green Fluorescent Protein* (GFP) permet de visualiser dans le temps les étapes de colonisation bactérienne au sein de la larve d'insecte (Sicard et al. 2004). L'hypothèse à vérifier statistiquement est : le plasmide contenant le gène GFP ne modifie-t-il pas la virulence de la souche sauvage ? La comparaison statistique des 3 essais pour chacune des 2 conditions (*Xenorhabdus* sauvage et *Xenorhabdus*

GFP) montre que le plasmide ne perturbe pas la fonction de virulence de notre modèle (**figure 5**). Cependant, dans d'autres modèles d'interactions, la présence de la GFP peut perturber la virulence de la bactérie. Par exemple, l'effet invasif de *Salmonella enterica* sur des cellules macrophagiques est modifié par la présence du plasmide codant pour la GFP (Knodler et al. 2005). Il est donc important dans chaque modèle d'étude de contrôler statistiquement les résultats de pathologie obtenus.

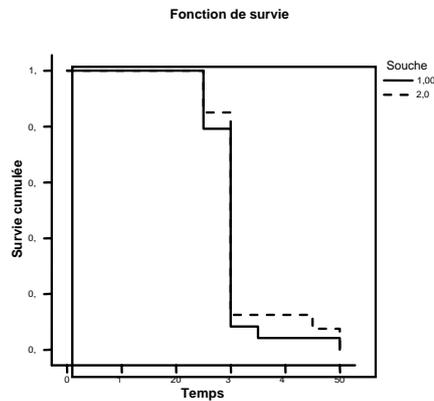


Figure 5 : Comparaison de courbes de survie entre *Xenorhabdus GFP* (souche 1) et *Xenorhabdus* souche sauvage (souche 2) $p = 0.2564$. Les fonctions de survie ne sont pas statistiquement différentes.

4. Conclusions et perspectives

Reproductible, sensible, avec les conditions expérimentales validées, ce test de pathogénicité par injection sur larves de *Spodoptera littoralis* permet d'identifier des niveaux différents de virulence bactérienne. Des gènes codant des molécules considérées comme potentiellement impliquées dans la pathologie sur l'insecte ont été étudiés. L'analyse statistique des courbes de survie nous permet de définir ou non leur implication. Ainsi, durant ces dernières années, en utilisant cette méthodologie standardisée, nous avons testé différents mutants isogéniques construits par l'équipe EMIP ou en collaboration avec d'autres laboratoires. Les gènes AstRS codant pour un système à deux composants (Derzelle et al. 2004), les gènes SctC impliqués dans le système de sécrétion de type III (Brugirard-Ricaud et al. 2005) ne sont pas impliqués dans la pathologie par injection sur des larves de *Spodoptera littoralis*. Les gènes codant les régulateurs, FlhDC impliqués dans la formation du système flagellaire des bactéries (Givaudan et al. 2000) et PhoPQ un système à deux composants chez *Photorhabdus luminescens* (Derzelle et al. 2004) sont à l'inverse impliqués dans la virulence de ces bactéries entomopathogènes.

Ce protocole expérimental est transposable à d'autres lépidoptères (*Galleria mellonella*) voire même à d'autres ordres d'insectes cibles (Orthoptère, Coléoptère...) en respectant les conditions de la physiologie propre de l'insecte considéré. Certains paramètres d'ordre climatique comme la température, la photopériode seront à réadapter mais aussi le stade larvaire et la dose de bactéries viables à injecter. La liste des paramètres à considérer n'est pas exhaustive, elle doit être considérée comme un guide. Il est important de valider ces paramètres car ils peuvent conduire à l'absence de reproductibilité des essais.

Références bibliographiques

- Akhurst, R.J 1980. Morphological and functional dimorphism in *Xenorhabdus spp.*, bacteria associated with the insect pathogenic nematodes *Neoplectana* and *Heterorhabditis*. **Journal of General Microbiology** 121, 303-309
- Brillard, J. Duchaud, E. Boemare, N. Kunst, F. and Givaudan, A. 2002. The PhIA hemolysin from the entomopathogenic bacterium *Photorhabdus luminescens* belongs to the two partner secretion family of hemolysins. **Journal of Bacteriology** 184, 3871-3878
- Brugirard-Ricaud, K. Duchaud, E. Givaudan, A. Girard, P.A. Kunst, F. Boemare, N. Brehélin, M. Zumbihl, R. 2005. Site-specific antiphagocytic function of the *Photorhabdus luminescens* type III secretion system during insect colonization. **Cellular Microbiology** 7, 363-371
- Bucher, E. 1960. Potential bacterial pathogens of insects and their characteristics. **Journal of Insect Pathology** 2, 172-195
- Derzelle, S. Turlin, E. Duchaud, E. Pagès, S. Kunst, F. Givaudan, A. and Danchin, A. 2004. The PhoP-PhoQ two component regulatory system of *Photorhabdus luminescens* is essential for virulence in insects. **Journal of Bacteriology** 186, 1270-1279.
- Givaudan, A. Lanois, A.2000. *flhDC*, the flagellar master operon of *Xenorhabdus nematophila* : requirement for motility, lipolysis, extracellular hemolysis, and full virulence in insects. **Journal of Bacteriology** 182, 107-115.
- Knodler, L.A. Beston, A. Ma, C. Hansen-Wester, I. Hensel, M. Vallance, B.A. and Steele-Mortimer, O. 2005. Cloning vectors and fluorescent proteins can significantly inhibit *Salmonella enterica* virulence in both epithelial cells and macrophages: implications for bacterial pathogenesis studies. **Infection and Immunity** 73, 7027-7031
- Poitout, S. Bues, R. 1970. Elevage de plusieurs espèces de lépidoptères *noctuidae* sur milieu artificiel riche et sur milieu artificiel simplifié. **Annales de Zoologie Ecologie animale** 2,79-91
- Rehrig, S.T. Marshall, S. Meghoo, C. Peoples, G.E. Shriver, C.D. 2001. 5-year qualitative results of isolated cryosurgical ablation for hepatic malignancy at Walter Reed Army Medical Center. **Current Surgery** 58, 81-85.
- Sicard, M. Brugirard-Ricaud, K. Pagès, S. Lanois, A. Boemare, N. Brehélin, M. and 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.

