

## La fluorescence

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

<sup>1</sup>Sylvie 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

---

<sup>1</sup> 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](mailto: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.

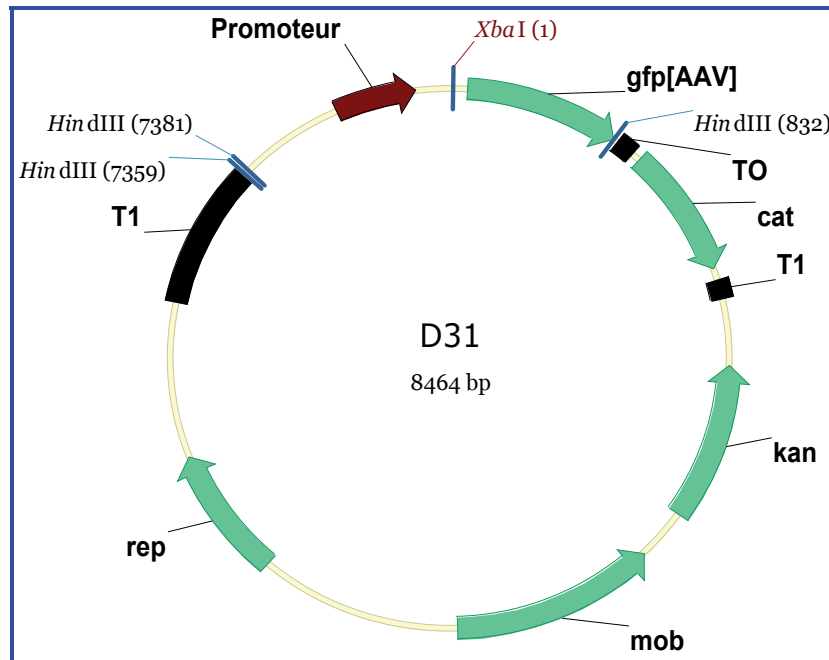
## 1. Matériels, méthodes et résultats

### 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 ( $\lambda$ ) 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 (RPAANDENYAAV), 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  $\lambda$  excitation est 485 +/- 4.5 nm et  $\lambda$  émission : 520 +/- 10 nm.

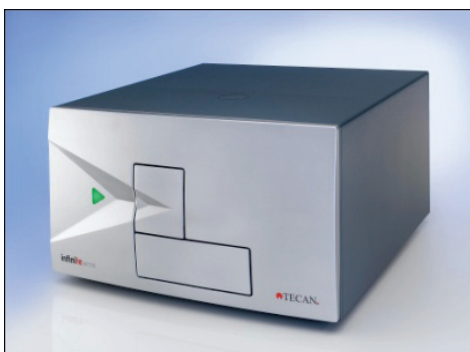
Nous avons construit une fusion transcriptionnelle entre un promoteur constitutif de *Xenorhabdus nematophila* et le gène codant la GFP-AAV dans le plasmide pPROBE'*gfp*[AAV]. Le plasmide ainsi obtenu nommé D31pPROBE'*gfp*[AAV] (**figure 1**) a été transféré par conjugaison chez *Xenorhabdus nematophila* 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

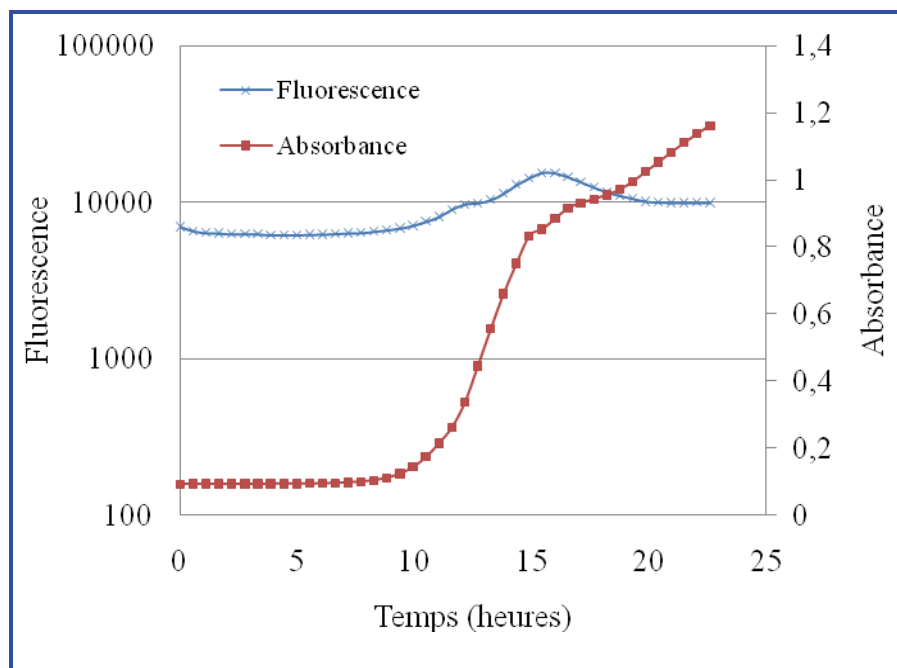
## 1.2 Contrôle *in vitro* des fusions bactériennes *gfp*[AAV]

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 ( $\lambda$  à 600 nm) et de fluorescence ( $\lambda$  excitation 485 +/- 4.5 nm,  $\lambda$  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 Ca<sup>2+</sup> et Mg<sup>2+</sup> (Gibco) puis centrifugée (5 mn à 13000 tr/mn). Un ml de culture lavée est dilué jusqu'à la dilution de 10<sup>-3</sup> de façon à injecter dans le corps des larves d'insecte environ 10<sup>+4</sup> 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<sup>-3</sup> 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<sup>ème</sup> et la 3<sup>ème</sup> 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.

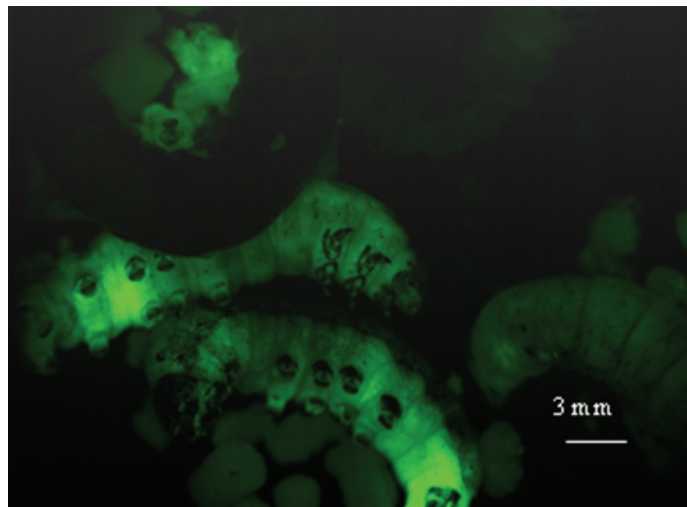
La boîte contenant les larves est placée dans une enceinte thermostatée à 23°C +/- 1°C, disposant d'un système d'éclairage jour/nuit contrôlant la photopériode L16 :D8 (16 heures de jour et 8 heures de nuit) pendant 20 heures.

#### 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.

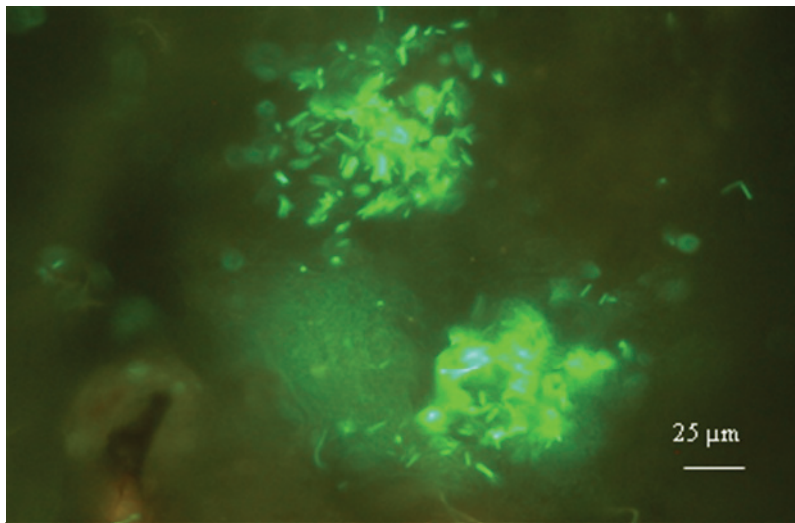
- témoin négatif F1pPROBE'gfp[AAV] : Nous n'observons pas de fluorescence avec un temps d'acquisition de 1 seconde. En revanche, en augmentant le temps d'acquisition au-delà de 1 seconde, on observe une auto-fluorescence.
- fusion constitutive F1D31pPROBE'gfp[AAV] : Grâce au signal fluorescent avec,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



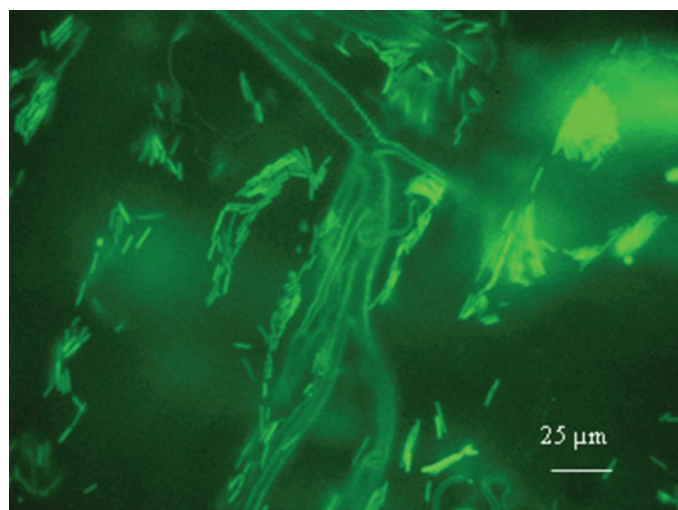
**Photo 1** © Inra/Sylvie Pagès : *hétérogénéité de la fluorescence parmi des larves de Spodoptera littoralis infectées par Xenorhabdus nematophila F1D31pPROBE'gfp[AAV] au début de l'infection bactérienne (macroscopie à épifluorescence)*

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'hémolymphe<sup>2</sup> 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)*

---

<sup>2</sup> 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  $\lambda$  excitation 485 +/- 4.5 nm et à  $\lambda$  émission 520 +/- 10 nm. Les résultats sont automatiquement transférés dans un fichier Excel.

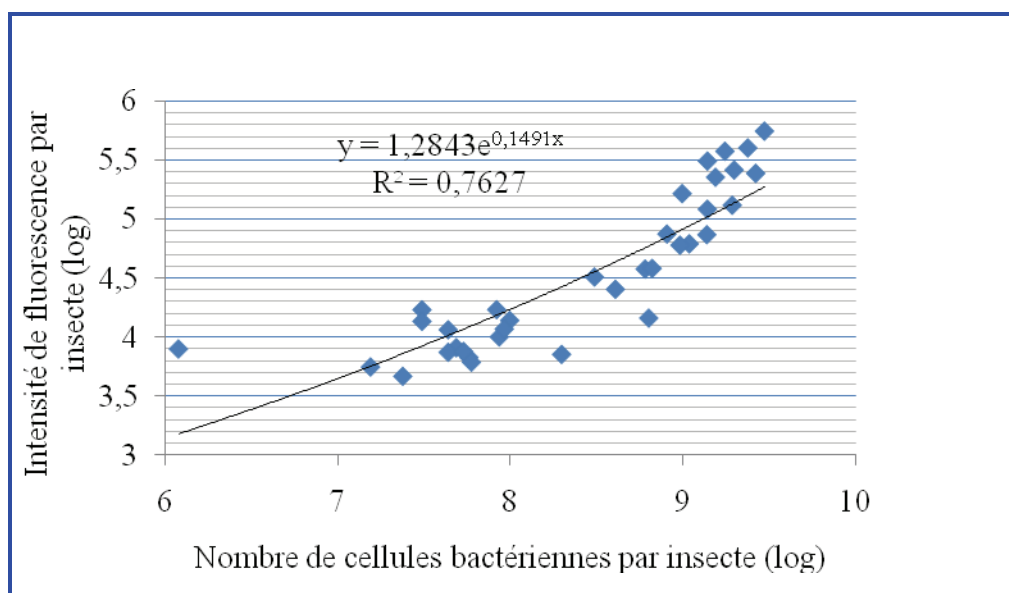
### 1.5.4 Dénombrement des cellules bactériennes

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 mm<sup>3</sup>, 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)

