

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*

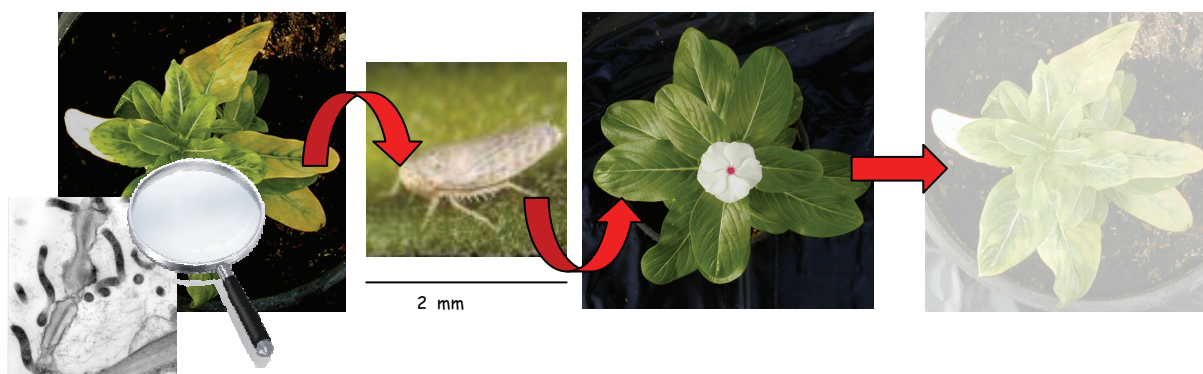
Brigitte Batailler^{1 2} et Nathalie Arricau-Bouvery¹

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 corrélérer.

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.

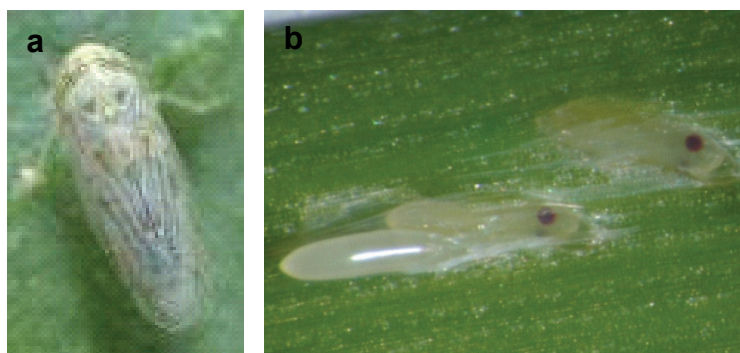
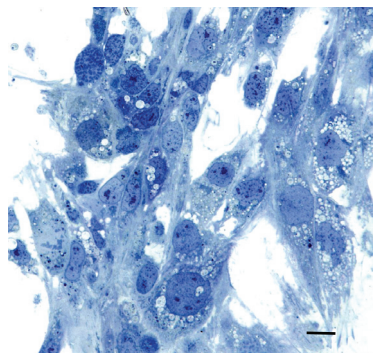


Figure 1 : *Circulifer haematoceps* - a) insecte adulte ; b) œufs embryonnés âgés de 8 jours

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

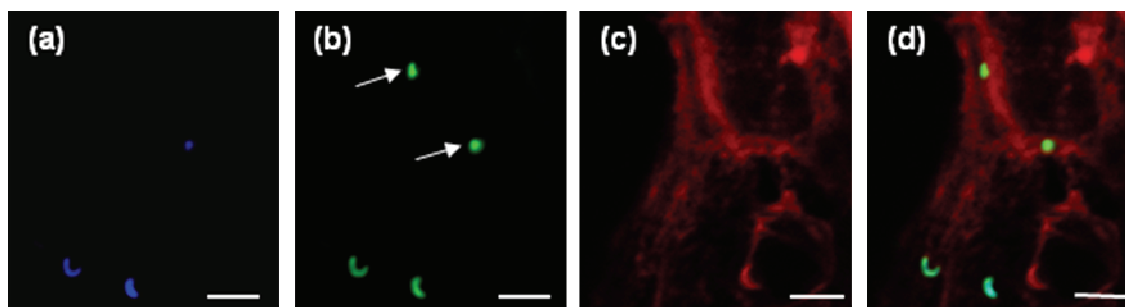


Figure 3 : observation en microscopie confocale de cellules *Ciha-1* infectées par *S. citri-GII3*
 (a) *S. citri* extracellulaire - Alexa 633; (b) *S. citri* intracellulaire (flèches) - Alexa 488(après perméabilisation)
 (c) Actine - Phalloidine – Alexa 514 (d) image superposée. Barres d'échelle : 5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

Au cours de ce travail, deux types principaux de morphologie ont été observés au niveau des spiroplasmes 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 spiroplasmes ovoïdes internalisés en microscopie électronique comparativement aux observations faites en microscopie confocale (résultats non produits).

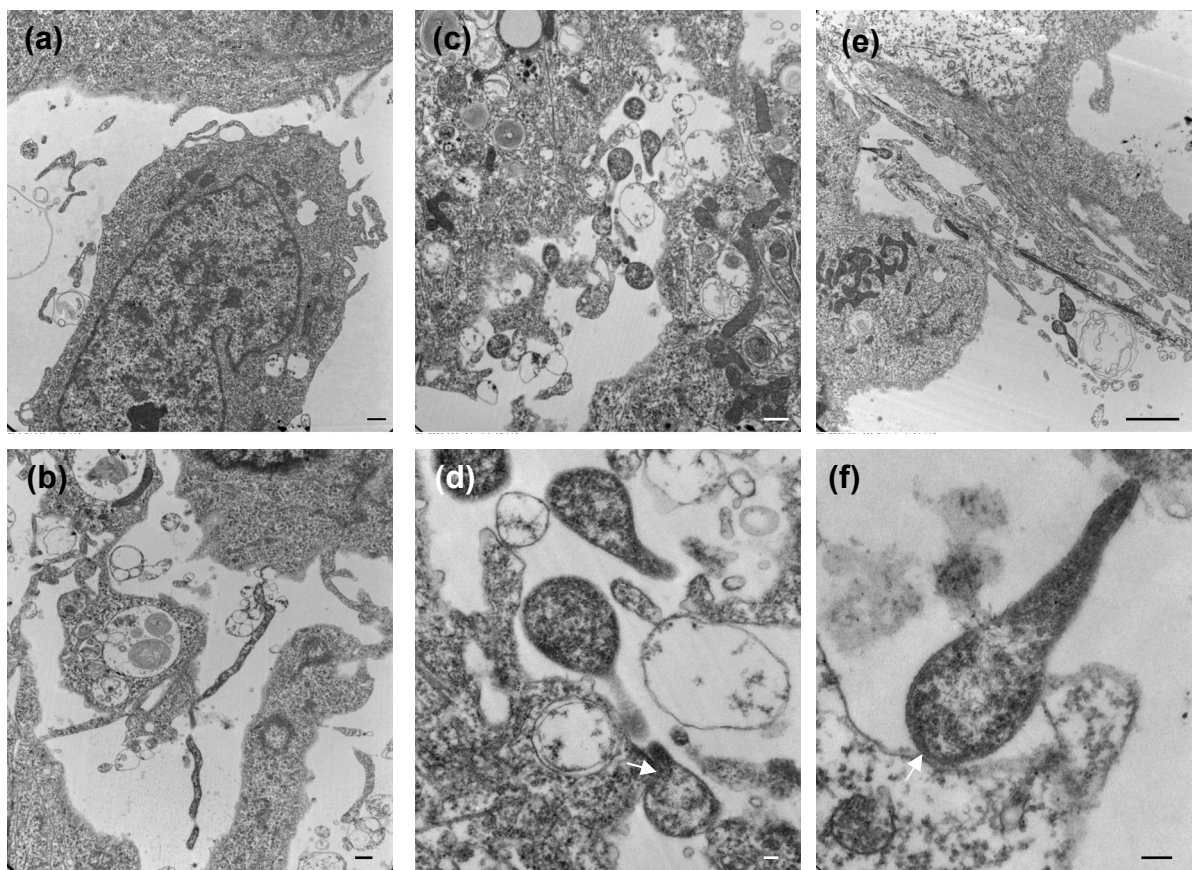


Figure 4 : cellules *Ciha-1* observées en microscopie électronique à transmission, 18h après infection
 (a) Cellule *Ciha-1* non infectée (x 10500) ;
 (b) spiroplasmes extracellulaires à morphologie hélicoidale (x 10500) ;
 (c) vue d'ensemble d'un espace intercellulaire (x 13500) ;
 (d) détail de l'image 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 spiroplasmés 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)