

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.

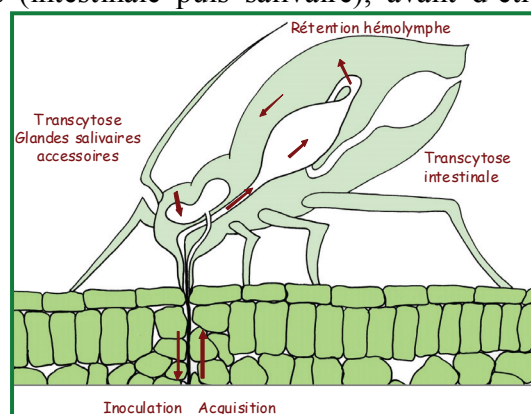
Mots clés : microscopie électronique à transmission, MET, puceron, virus

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 capside 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**).

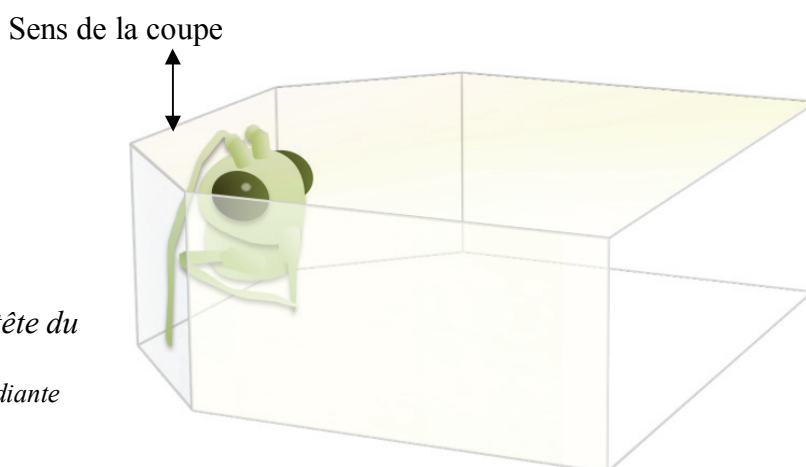


Figure 2 : orientation de la tête du puceron dans la résine
(schéma © Caroline Hemmer, étudiante en thèse à l'Inra)

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.

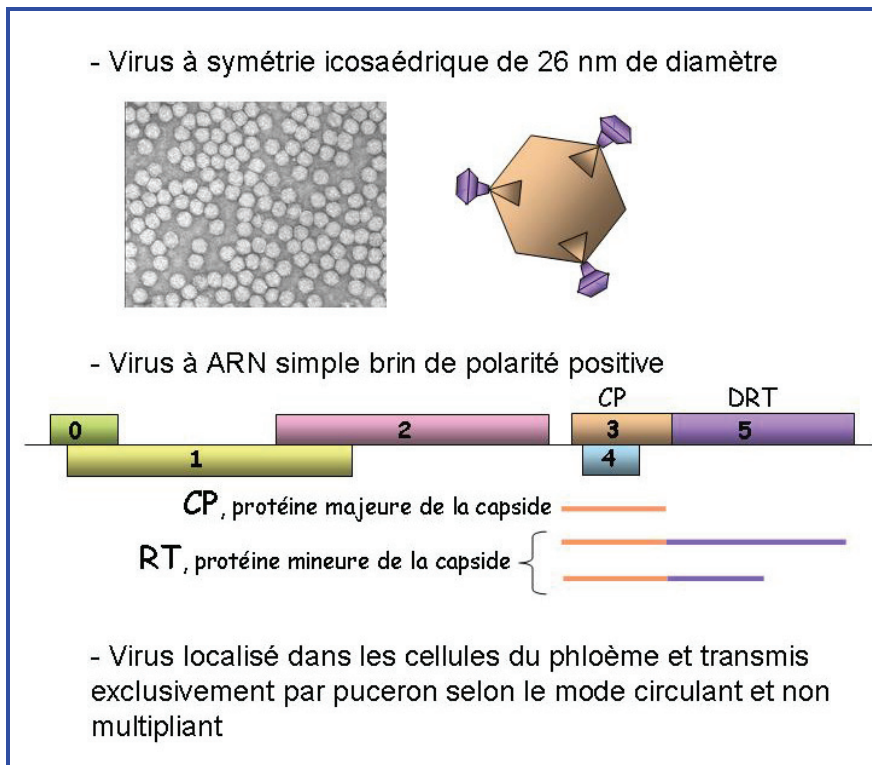
Remplir la boîte de coloration de la solution de citrate de plomb et la placer dans un bécher contenant quelques cristaux de KOH. Sceller avec du parafilm et laisser agir 10 mn.

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*

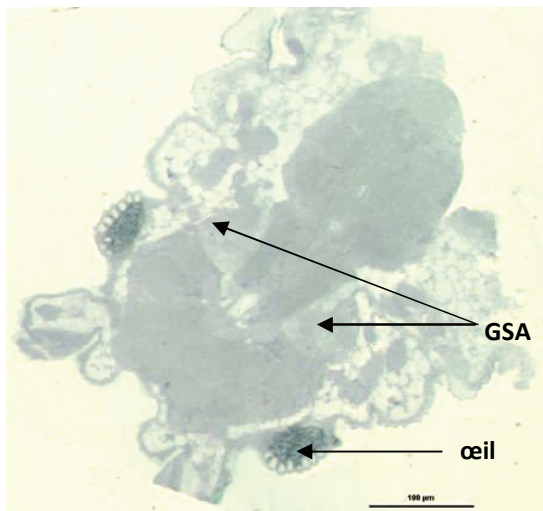


Figure 3 : *coupe frontale de tête de puceron colorée au bleu azur B observée en microscopie optique*

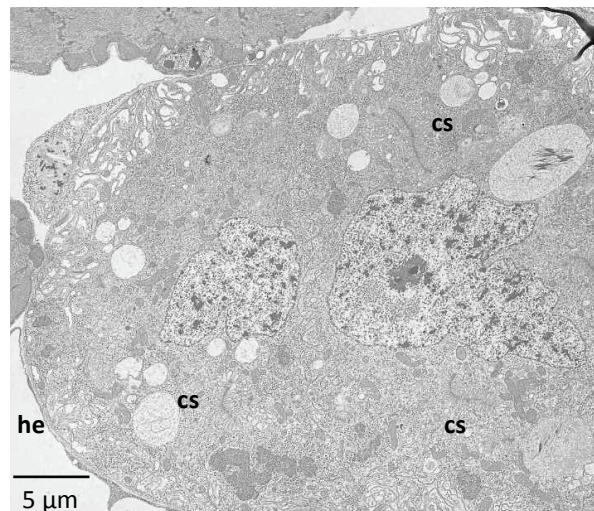


Figure 4 : *coupe de GSA*

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**)

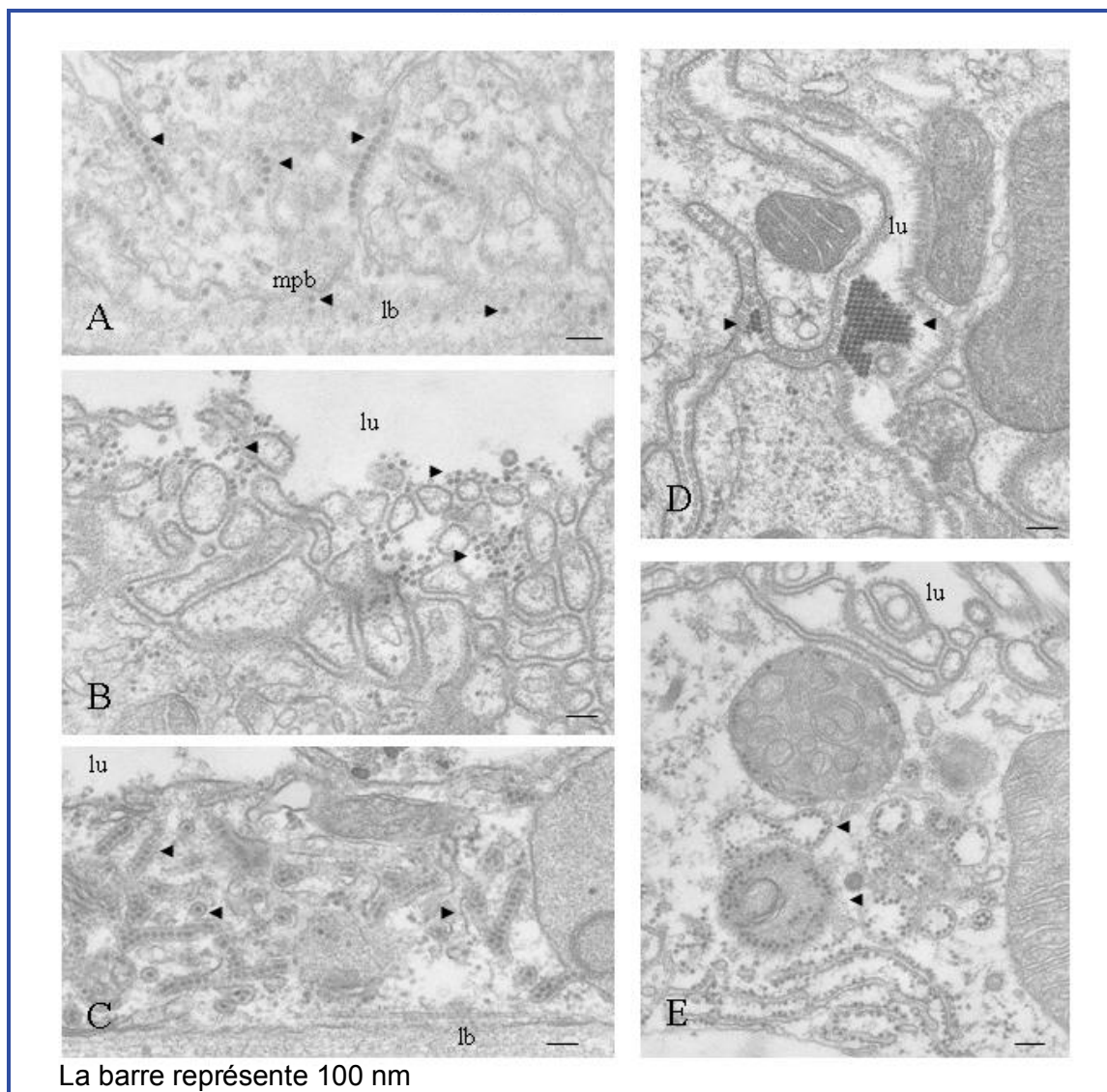


Figure 5 :

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

