

Culture *in vitro* de *Candidatus Liberibacter asiaticus*, une α -proteobactérie associée au Greening des agrumes

Lisa Fontaine-Bodin, Frédéric Gatineau, Sandrine Fabre et Michel Dollet
 CIRAD-BIOS, Etiologie, Dépérissements, TA A 29/F, Campus International de Baillarguet, 34398 Montpellier cedex 5
 email: lisa.fontaine_bodin@cirad.fr



Fig. 3. Symptômes du Greening

Une menace sur les agrumes méditerranéens

La maladie du Huanglongbing (HLB) ou Greening, s'attaque aux agrumes et se propage via l'insecte-vecteur **psylle** (Fig.1) ou par **greffe**. Cette maladie est présente en Afrique, Moyen Orient, Asie, Brésil, Floride, Caraïbes et Amérique centrale. Elle est une grave menace pour le bassin méditerranéen (Fig.2).

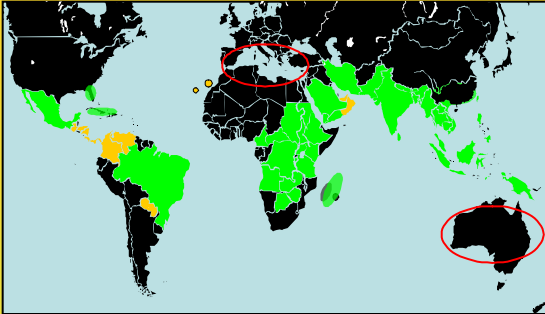


Fig.2. Présence de la maladie HLB et de l'insecte vecteur psylle
 - HLB+psylle
 - psylle

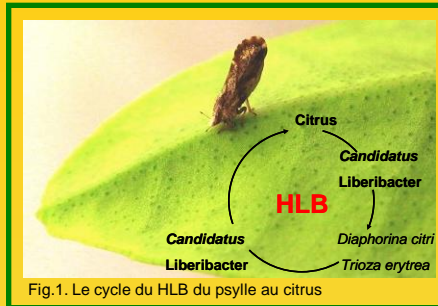


Fig.1. Le cycle du HLB du psylle au citrus

Co-culture *in vitro* de *Liberibacter* avec des cellules « nourrices »

Liberibacter se multiplie dans les tubes criblés de citrus et dans son vecteur. D'autres parasites ou agents pathogènes intraphloémiques réputés non cultivables ont pu être co-cultivés avec des cellules d'insectes (ex: Trypanosomatides, Menara *et al.*, 1988). Ces cellules « nourrices » fournissent en continu des éléments nutritifs favorables à leur croissance. Notre stratégie est de tester **différentes cultures cellulaires d'insectes** inoculées avec *Candidatus Liberibacter asiaticus* (LAS), la souche asiatique de la maladie du HLB, détectée aussi en Floride (Fig.4).

Candidatus Liberibacter, agent du HLB

Le HLB est associé à la présence d'une bactérie dans le phloème de citrus symptomatiques (Fig.1 et 3). Cette bactérie est une α -proteobactérie, considérée comme non-cultivable et nommée *Candidatus Liberibacter spp.* Le rôle de cette bactérie dans l'étiologie de la maladie reste à démontrer selon le postulat de Koch. Obtenir une **culture pure de Liberibacter** est primordial et reste un challenge. De récentes études (Sechler *et al.*, 2009) ont fait un pas vers la culture *in vitro* de *Liberibacter asiaticus* (LAS). Mais aucune croissance exponentielle en milieu liquide n'a cependant été décrite. L'étude de la physiologie et du pouvoir pathogène de la bactérie reste donc **très limitée**.

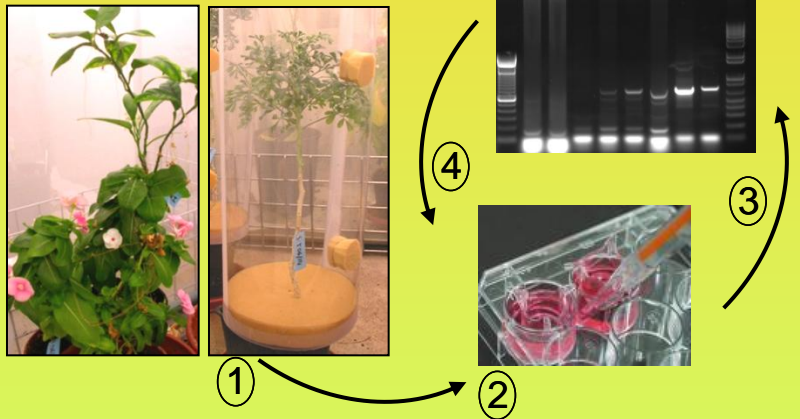


Fig.4. Co-culture de LAS avec des cellules nourrices d'insectes.
 1- Développement en serre d'une collection de plantes (citrus et pervenche de Madagascar) infectées par LAS
 2- Inoculation de LAS dans différentes lignées de cellules d'insectes
 3- Détection de LAS dans les cultures cellulaires par PCR directe (rplA2/rplJ5)
 4- Amélioration du milieu de culture

Résultats

- A ce jour, pas de détection de la présence de LAS après inoculation dans différentes cultures cellulaires de *Mamestra brassicae*, *Spodoptera frugiperda* et *Aedes albopictus* (4 lignées au total testées dans différents milieux de culture).
- Nous avons obtenu une multiplication de LAS avec des **cellules de drosophiles**. La bactérie est détectable par PCR directe après plusieurs transferts. Une des lignées en est à son 15ème transfert positif pour LAS.
- Les tests de **complémentation** (sucres, vitamines, éléments traces...) ont permis d'obtenir des **effets positifs** sur le maintien et la croissance de LAS.

Perspectives

- Analyses en **qPCR multiplexée** de la quantité de LAS en fonction du temps et de la concentration de cellules d'insectes.
- **Combinaisons** des compléments de milieux, tests de milieux alternatifs pour augmenter la concentration de LAS.
- Analyses des milieux de cultures cellulaires d'insectes, sucres, acides aminés, minéraux en fonction du temps pour identifier de potentiels **facteurs limitant la croissance**.
- **Axénisation** de la culture de LAS.



Projet financé par:

