



**HAL**  
open science

# Développement embryonnaire du puceron *Acyrtosiphon pisum* : caractérisation de voies métaboliques et gènes clé dans les interactions trophiques avec *Buchnera aphidicola*

Andréane Rabatel

► **To cite this version:**

Andréane Rabatel. Développement embryonnaire du puceron *Acyrtosiphon pisum* : caractérisation de voies métaboliques et gènes clé dans les interactions trophiques avec *Buchnera aphidicola*. Interactions entre organismes. INSA de Lyon, 2011. Français. NNT : 2011 ISAL 0137 . tel-00673174v1

**HAL Id: tel-00673174**

**<https://theses.hal.science/tel-00673174v1>**

Submitted on 22 Feb 2012 (v1), last revised 14 Jun 2012 (v2)

**HAL** is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

Thèse

**Développement embryonnaire du puceron  
*Acyrtosiphon pisum* : caractérisation de voies métaboliques  
et gènes clé dans les interactions trophiques avec  
*Buchnera aphidicola***

présentée devant  
**L'Institut National des Sciences Appliquées de Lyon**

pour obtenir  
**le grade de Docteur**

**Ecole doctorale** : Evolution, Ecosystèmes, Microbiologie, Modélisation  
**Spécialité** : Micro-organismes, interactions, infections

Par

**Andréane RABATEL**

Soutenue le 12/12/2011 devant la Commission d'examen

**Jury**

---

Véronique BRAULT	Directrice de recherche	Rapporteur
Elisabeth HUGUET	Professeur	Rapporteur
Stefano COLELLA	Chargé de recherche	Examineur
Nathalie MONDY	Maître de conférences, HDR	Examineur
Nathalie VOLKOFF	Directrice de recherche	Examineur
Federica CALEVRO	Maître de conférences	Directeur
Gérard FEBVAY	Directeur de recherche	Directeur

Laboratoire de recherche : Biologie Fonctionnelle Insectes et Interactions (BF2I)





**INSA Direction de la Recherche - Ecoles Doctorales – Quinquennal 2011-2015**

SIGLE	ECOLE DOCTORALE	NOM ET COORDONNEES DU RESPONSABLE
<b>CHIMIE</b>	<b>CHIMIE DE LYON</b> <a href="http://www.edchimie-lyon.fr">http://www.edchimie-lyon.fr</a>  Insa : R. GOURDON	<b>M. Jean Marc LANCELIN</b> Université de Lyon – Collège Doctoral Bât ESCPE 43 bd du 11 novembre 1918 69622 VILLEURBANNE Cedex Tél : 04.72.43 13 95 <a href="mailto:directeur@edchimie-lyon.fr">directeur@edchimie-lyon.fr</a>
<b>E.E.A.</b>	<b>ELECTRONIQUE, ELECTROTECHNIQUE, AUTOMATIQUE</b> <a href="http://edeea.ec-lyon.fr">http://edeea.ec-lyon.fr</a>  Secrétariat : M.C. HAVGOUDOUKIAN <a href="mailto:eea@ec-lyon.fr">eea@ec-lyon.fr</a>	<b>M. Gérard SCORLETTI</b> Ecole Centrale de Lyon 36 avenue Guy de Collongue 69134 ECULLY Tél : 04.72.18 60 97 Fax : 04 78 43 37 17 <a href="mailto:Gerard.scorletti@ec-lyon.fr">Gerard.scorletti@ec-lyon.fr</a>
<b>E2M2</b>	<b>EVOLUTION, ECOSYSTEME, MICROBIOLOGIE, MODELISATION</b> <a href="http://e2m2.universite-lyon.fr">http://e2m2.universite-lyon.fr</a>  Insa : H. CHARLES	<b>Mme Gudrun BORNETTE</b> CNRS UMR 5023 LEHNA Université Claude Bernard Lyon 1 Bât Forel 43 bd du 11 novembre 1918 69622 VILLEURBANNE Cédex Tél : 04.72.43.12.94 <a href="mailto:e2m2@biomserv.univ-lyon1.fr">e2m2@biomserv.univ-lyon1.fr</a>
<b>EDISS</b>	<b>INTERDISCIPLINAIRE SCIENCES-SANTE</b> <a href="http://ww2.ibcp.fr/ediss">http://ww2.ibcp.fr/ediss</a>  Sec : Safia AIT CHALAL Insa : M. LAGARDE	<b>M. Didier REVEL</b> Hôpital Louis Pradel Bâtiment Central 28 Avenue Doyen Lépine 69677 BRON Tél : 04.72.68 49 09 Fax :04 72 35 49 16 <a href="mailto:Didier.revel@creatis.univ-lyon1.fr">Didier.revel@creatis.univ-lyon1.fr</a>
<b>INFOMATHS</b>	<b>INFORMATIQUE ET MATHEMATIQUES</b> <a href="http://infomaths.univ-lyon1.fr">http://infomaths.univ-lyon1.fr</a>	<b>M. Johannes KELLENDONK</b> Université Claude Bernard Lyon 1 INFOMATHS Bâtiment Braconnier 43 bd du 11 novembre 1918 69622 VILLEURBANNE Cedex Tél : 04.72. 44.82.94 Fax 04 72 43 16 87 <a href="mailto:infomaths@univ-lyon1.fr">infomaths@univ-lyon1.fr</a>
<b>Matériaux</b>	<b>MATERIAUX DE LYON</b>  Secrétariat : M. LABOUNE PM : 71.70 –Fax : 87.12 Bat. Saint Exupéry <a href="mailto:Ed.materiaux@insa-lyon.fr">Ed.materiaux@insa-lyon.fr</a>	<b>M. Jean-Yves BUFFIERE</b> INSA de Lyon MATEIS Bâtiment Saint Exupéry 7 avenue Jean Capelle 69621 VILLEURBANNE Cédex Tél : 04.72.43 83 18 Fax 04 72 43 85 28 <a href="mailto:Jean-yves.buffiere@insa-lyon.fr">Jean-yves.buffiere@insa-lyon.fr</a>
<b>MEGA</b>	<b>MECANIQUE, ENERGETIQUE, GENIE CIVIL, ACOUSTIQUE</b>  Secrétariat : M. LABOUNE PM : 71.70 –Fax : 87.12 Bat. Saint Exupéry <a href="mailto:mega@insa-lyon.fr">mega@insa-lyon.fr</a>	<b>M. Philippe BOISSE</b> INSA de Lyon Laboratoire LAMCOS Bâtiment Jacquard 25 bis avenue Jean Capelle 69621 VILLEURBANNE Cedex Tél :04.72.43.71.70 Fax : 04 72 43 72 37 <a href="mailto:Philippe.boisse@insa-lyon.fr">Philippe.boisse@insa-lyon.fr</a>
<b>ScSo</b>	<b>ScSo*</b>  <b>M. OBADIA Lionel</b>  Sec : Viviane POLSINELLI Insa : J.Y. TOUSSAINT	<b>M. OBADIA Lionel</b> Université Lyon 2 86 rue Pasteur 69365 LYON Cedex 07 Tél : 04.78.69.72.76 Fax : 04.37.28.04.48 <a href="mailto:Lionel.Obadia@univ-lyon2.fr">Lionel.Obadia@univ-lyon2.fr</a>

\*ScSo : Histoire, Géographie, Aménagement, Urbanisme, Archéologie, Science politique, Sociologie, Anthropologie



*A mes parents, Marie-Hélène et Jean-Pierre  
A mon Ange Gardien*





Je remercie M. Yvan Rahbé, directeur de l'UMR 203 INRA / INSA de Lyon, pour m'avoir permis de réaliser cette thèse de doctorat au sein de son unité ainsi que pour le temps qu'il m'a accordé lors de chacune de mes sollicitations.

Je tiens à exprimer ma sincère gratitude aux rapporteurs de cette thèse : Mme Véronique Brault et Mme Elisabeth Huguet ainsi qu'aux autres membres du jury : M. Stefano Colella, Mme Nathalie Mondy et Mme Nathalie Volkoff, qui ont accepté de juger ce travail de thèse.

Je remercie également les membres de mon comité de pilotage, Mme Elisabeth Huguet, Mme Marylène Poirié, M. Denis Tagu et M. Hubert Charles, pour leurs points de vue extérieurs ainsi que pour nos échanges constructifs lors des réunions de ce comité.

Merci à ma directrice de thèse, Federica Calevro, de m'avoir toujours soutenue et de m'avoir fait confiance pendant mon Master et ces trois années de thèse. Je lui suis profondément reconnaissante de m'avoir donné tous les éléments nécessaires pour mener à bien ma thèse et être prête un jour à accomplir ma mission de chercheur. Je me souviendrai toujours des moments partagés en salle de microscopie à observer nos petits embryons de puceron se développant, dans nos milieux de culture, sous nos yeux émerveillés.

Merci à mon directeur de thèse, Gérard Febvay, de m'avoir initiée au métabolisme des acides aminés et de m'avoir appris à décortiquer mes profils HPLC et eu la patience de m'expliquer inlassablement comment interpréter biologiquement les changements observés. Car oui, bien que tout ne soit « qu'une » question d'équilibre, ce fut souvent pour moi un véritable casse-tête chinois.

Ce projet n'aurait pu être conduit sans le travail qu'a fourni Stefano Colella lors de l'annotation du génome du puceron du pois et des gènes impliqués dans la synthèse d'acides aminés, et surtout lors du développement de la première puce à oligonucléotides dédiée au génome du puceron du pois et que j'ai utilisée durant ma thèse. Je le remercie d'avoir su me faire découvrir et explorer le monde de la bio-informatique sans m'effrayer ; qu'il s'agisse de l'utilisation des diverses bases de données ou des logiciels d'analyse.

Dans le même domaine, je tiens aussi à remercier Patrice Baa-Puyoulet pour son implication au bon fonctionnement de la base AcypiCyc et pour son aide précieuse lors de mes nombreux « bugs informatiques ».

Merci à Hubert Charles, responsable de l'équipe SymTrophique, pour avoir toujours soutenu mon projet et pour sa précieuse contribution au traitement statistique des données de puce à ADN. Merci d'avoir transformé cette montagne de données en un mont dont j'ai pu explorer et gravir les pentes. Je le remercie également de m'avoir guidée jusque dans les entrailles de la terre à l'occasion d'une sortie spéléologique qu'il a eu la gentillesse d'organiser pour les membres du laboratoire.

Je souhaite remercier Gabrielle Dupont, qui est au BF2I ce qu'on appelle une « fondatrice » chez les pucerons : sans elle, aucune des nos « pucerottes » ne verrait le jour et ne serait en si bonne santé. Je lui suis reconnaissante de son soutien et de m'avoir transmis une part de son expertise concernant l'élevage, la manipulation et la dissection des pucerons.

Je tiens également à remercier Karen Gaget pour sa contribution aux manipulations de biologie moléculaire et pour le grand soin avec lequel elle a su réaliser ces expériences. Je n'oublie pas qu'elle a également été une amie pour moi.

Merci également à Séverine Balmand, Nadia Bendridi, Alain Clavel, Pierre Masselot, Marjolaine Rey et Panagiotis Sapountzis d'avoir beaucoup contribué à ce grand projet.

Un grand merci à mon jumeau de thèse, Aurélien Vigneron, pour son amitié, son support et nos nombreuses discussions ... Ce fut un réel plaisir de partager cette aventure au BF2I avec lui !

Merci à tous les autres membres du laboratoire BF2I :

Patrice Bolland, Lilia Brinza, Elyane Chassignol, Denis Costechareyre, Vanessa Eyraud, Heidi Eppe, Catherine Garcia, Frédéric Gressent, Abdelaziz Heddi, Lamys Karaki, Adrien Merville, Carole Monégat, Nicolas Parisot, Jacques Pintureau, Isabelle Rahioui, Lionel Razy, Corinne Royer, Catherine Sivignon et Agnès Vallier pour leur accueil et les excellents moments que j'ai passés en leur compagnie.

Je remercie mes parents pour leur présence, leur soutien et leur immense foi en moi. Je remercie chaleureusement ma mère qui en toutes circonstances a su trouver les bons mots, ce qui n'a pas toujours été chose facile.

Un grand merci à toute ma famille pour leurs encouragements et une pensée particulière pour mon grand-père Henri de m'avoir honorée de sa présence le jour de ma soutenance.

Je remercie également mon Adrien pour avoir été, malgré la distance, d'une remarquable présence et d'un immense soutien et réconfort, et sans qui cette aventure aurait été bien plus dure.

Merci à Mélanie Racine, d'avoir joué son rôle de sœur de cœur à la perfection. Je la remercie pour son grain de folie, son sourire, son dynamisme et son immense confiance en moi, qui ont été de véritables bouffées d'air frais vivifiantes pendant les moments difficiles.

Une pensée pour mes amies Liberty Moutal et Elise Rivière et Isabelle Rochet qui m'ont aidée à surmonter les épreuves au cours de mes longues années d'études universitaires.

Merci également à mes compagnons de thèses et/ou colocataires : Tony Campillo, Lysiane Dunière ainsi que Sébastien Buffier et Nicolas Gehin avec qui il a été bon de faire ce bout de chemin ensemble.

---







# Table des matières



<b>Table des matières .....</b>	<b>11</b>
<b>Liste des Figures .....</b>	<b>17</b>
<b>Liste des Tableaux .....</b>	<b>23</b>
<b>Liste des Abréviations .....</b>	<b>27</b>
<b>Avant-propos .....</b>	<b>29</b>
<b>Partie I - Introduction .....</b>	<b>33</b>
<b>1 Les pucerons et leur importance agronomique.....</b>	<b>35</b>
1.1 Cycle de vie des pucerons .....	35
1.1.1 Polyphénisme de reproduction .....	36
1.1.2 Formes ailées et aptères .....	38
1.1.3 Autres polyphénismes .....	40
1.2 Mode d'alimentation .....	41
1.3 Impacts sur les plantes .....	44
<b>2 La physiologie nutritionnelle des pucerons : le couple <i>Buchnera</i>/puceron .....</b>	<b>47</b>
2.1 Composition de la sève phloémienne .....	48
2.2 La bactérie symbiotique <i>Buchnera aphidicola</i> .....	50
2.3 Le génome de <i>Buchnera aphidicola</i> .....	52
2.4 Le génome du puceron du pois .....	56
2.4.1 Les gènes du transport .....	57
2.4.2 Les gènes des protéines cuticulaires .....	58
2.4.3 Les gènes du développement .....	59
2.4.4 Métabolisme des acides aminés et symbiose .....	59
2.5 Les études nutritionnelles .....	63
<b>3 Le cycle de vie, la reproduction et le développement du puceron .....</b>	<b>67</b>
3.1 Cycle de développement larvaire .....	67
3.2 Reproduction et développement embryonnaire .....	68
3.3 Transmission de <i>Buchnera aphidicola</i> .....	73
<b>4 Les besoins nutritionnels des embryons .....</b>	<b>79</b>

4.1	Production des oocytes et leur approvisionnement .....	79
4.2	Structures ovariennes à rôle trophique chez le puceron parthénogénétique .....	81
4.3	Besoins nutritionnels de l'embryon parthénogénétique .....	83
<b>Partie II - Matériel et Méthodes .....</b>		<b>87</b>
<b>1</b>	<b>Le matériel biologique .....</b>	<b>89</b>
1.1	Les pucerons : élevage de masse et élevage synchronisé .....	89
1.1.1	L'élevage de masse .....	89
1.1.2	L'élevage synchronisé .....	90
1.2	Les embryons : caractérisation et isolement .....	90
<b>2</b>	<b>Analyse des besoins en acides aminés du puceron du pois au cours du développement .....</b>	<b>93</b>
2.1	Evolution du contenu en acides aminés au cours du développement .....	93
2.1.1	Choix et préparation des échantillons .....	93
2.1.2	Extraction des acides aminés .....	94
2.1.3	Analyse et quantification des acides aminés par HPLC .....	94
2.2	Développement <i>in vitro</i> des embryons .....	95
2.2.1	Milieux et conditions de culture .....	95
2.2.2	Suivi du développement .....	97
2.2.3	Composition en acides aminés des embryons mis en culture .....	97
<b>3</b>	<b>Analyse du transcriptome du puceron du pois au cours de son développement embryonnaire et larvaire .....</b>	<b>99</b>
3.1	Réalisation des puces à ADN .....	99
3.2	Choix et préparation des échantillons .....	101
3.3	Extraction et préparation des acides nucléiques .....	101
3.3.1	Extraction des ARN totaux .....	101
3.3.2	Production des ADN double brin .....	101
3.3.3	Contrôle de qualité des acides nucléiques .....	103
3.4	Acquisition et traitement des données de puces à ADN .....	106
3.5	Analyse statistique des données de puce à ADN .....	107
3.6	Validation des données de puce par RT-PCR en temps réel .....	109
3.6.1	Validation de la qualité des échantillons .....	109
3.6.2	Choix du gène de normalisation, choix des amorces .....	112
3.6.3	Réalisation des expériences de RT-PCR en temps réel .....	114
3.6.4	Normalisation et analyse statistique des données .....	117

<b>4</b>	<b>Caractérisation fonctionnelle par l'approche d'ARN interférents .....</b>	<b>119</b>
4.1	Production des ARN double brin (ARNdb) .....	119
4.1.1	Production et purification des ADNdb .....	119
4.1.2	Clonage des produits de PCR .....	120
4.1.3	Transcription <i>in vitro</i> des ARNdb et purification .....	122
4.2	Méthode d'administration des ARNdb .....	122
4.2.1	Administration de l'ARNdb par ingestion .....	122
4.2.2	Administration de l'ARNdb par injection .....	124
4.3	Suivi de mortalité et de fécondité .....	125
4.4	Suivi de l'expression du gène ACYPI007803 .....	125
	<b>Partie III - Résultats .....</b>	<b>127</b>
<b>1</b>	<b>Etude des besoins en acides aminés au cours du développement du puceron du pois .....</b>	<b>129</b>
1.1	Problématique de l'étude .....	129
1.2	Composition en acides aminés des embryons au cours du développement .....	130
1.3	Développement d'un système de culture pour les embryons du puceron du pois .....	133
1.3.1	Survie, développement et croissance des embryons sur différents milieux artificiels .....	133
1.3.2	Réponses métaboliques des embryons en culture .....	138
1.4	Discussion .....	143
<b>2</b>	<b>Analyse du transcriptome du puceron du pois au cours de son développement embryonnaire et larvaire .....</b>	<b>151</b>
2.1	Problématique de l'étude .....	151
2.2	Analyse globale du transcriptome .....	152
2.2.1	Analyse de la qualité des échantillons .....	152
2.2.2	Analyse globale au cours du développement .....	153
2.3	Analyse fonctionnelle des gènes variant significativement au cours du développement .....	155
2.3.1	Les gènes du développement .....	155
2.3.2	Les gènes du métabolisme .....	159
2.3.3	Les gènes du métabolisme des acides aminés .....	161
2.4	Enrichissement des classes fonctionnelles de gènes .....	168
2.4.1	Les gènes du transport d'acides aminés .....	170

2.4.2	Les gènes liés formation de la cuticule .....	171
2.5	Validation des données de puces par RT-PCR en temps réel .....	174
2.5.1	Choix du gène de normalisation .....	174
2.5.2	Comparaison du niveau d'expression entre les deux méthodes d'analyse .....	176
2.6	Discussion .....	177
<b>3</b>	<b>Confirmation du rôle fonctionnel du gène ACYPI007803 mis en évidence dans l'analyse transcriptomique .....</b>	<b>187</b>
3.1	Problématique de l'étude.....	187
3.2	Inactivation du gène ACYPI007803 .....	188
3.2.1	Suivi de la survie et de la reproduction.....	188
3.2.2	Quantification du niveau d'expression du gène ACYPI007803 après inactivation par RNAi .....	191
3.3	Discussion .....	193
	<b>Partie IV – Conclusions et perspectives .....</b>	<b>197</b>
	<b>Partie V – Publications et Communications.....</b>	<b>203</b>
	<b>Partie VI - Références bibliographiques.....</b>	<b>207</b>
	<b>Annexes .....</b>	<b>223</b>

# Liste des Figures





<b>Figure 1.</b> Cycles annuels de vie des pucerons avec alternance ou non de plantes hôtes (d'après Dixon 1998).....	36
<b>Figure 2.</b> Cycle de vie du puceron du pois <i>Acyrtosiphon pisum</i> illustrant le mode de reproduction (parthénogénétique ou sexué) en fonction des saisons (d'après Miura <i>et al.</i> 2003). .....	38
<b>Figure 3.</b> Formes ailées et aptères du puceron <i>Acyrtosiphon pisum</i> .....	39
<b>Figure 4.</b> Détail des pièces buccales des pucerons (d'après Brault <i>et al.</i> , 2007).....	42
<b>Figure 5.</b> Suivi <i>in situ</i> des activités alimentaires d'un puceron par la technique d'électropénétrographie (EPG).....	43
<b>Figure 6.</b> Symptômes viraux chez les plantes (d'après Brault <i>et al.</i> , 2007). .....	46
<b>Figure 7.</b> Composition moyenne en acides aminés de la sève phloémienne de deux légumineuses. ....	49
<b>Figure 8.</b> Localisation des bactéries symbiotiques <i>Buchnera aphidicola</i> au sein des bactériocytes et répartition de ces derniers dans la cavité abdominale du puceron. ....	51
<b>Figure 9.</b> Arbres phylogéniques de <i>Buchnera aphidicola</i> et des pucerons hôtes (d'après Rahbé <i>et al.</i> , 2007).....	52
<b>Figure 10.</b> Voie de biosynthèse de l'acide aminé branché isoleucine partagée entre le puceron du pois et sa bactérie symbiotique <i>B. aphidicola</i> (d'après Wilson <i>et al.</i> , 2010). ....	61
<b>Figure 11.</b> Voies de biosynthèse de la phénylalanine et de la tyrosine dans la symbiose de puceron du pois - <i>B. aphidicola</i> (d'après Wilson <i>et al.</i> , 2010).....	62
<b>Figure 12.</b> Voies de biosynthèse des acides aminés soufrés dans la symbiose puceron du pois - <i>B. aphidicola</i> (d'après Wilson <i>et al.</i> , 2010). ....	63
<b>Figure 13.</b> Développement larvaire du puceron <i>Acyrtosiphon pisum</i> sur plant de fève (d'après Febvay <i>et al.</i> , 1988). ....	68
<b>Figure 14.</b> Représentation des deux types d'ovarioles de puceron en fonction du mode de reproduction (d'après Le Trionnaire <i>et al.</i> , 2008). ....	69
<b>Figure 15.</b> Représentation schématique des étapes de perception et transduction de la photopériode induisant le changement de mode de reproduction chez les pucerons (d'après Simon <i>et al.</i> , 2010).....	70
<b>Figure 16.</b> Principales étapes du développement embryonnaire sexué ovipare chez le puceron du pois (d'après Miura <i>et al.</i> 2003). ....	71
<b>Figure 17.</b> Principales étapes du développement embryonnaire parthénogénétique vivipare chez le puceron du pois (d'après Miura <i>et al.</i> 2003). ....	73
<b>Figure 18.</b> Transmission de <i>Buchnera aphidicola</i> à un embryon de puceron (d'après Wilkinson <i>et al.</i> 2003).....	75
<b>Figure 19.</b> Localisation des bactéries symbiotiques et de leurs cellules hôtes à différents stades du développement embryonnaire du puceron (d'après Braendle <i>et al.</i> , 2003 et Miura <i>et al.</i> , 2003).....	76

<b>Figure 20.</b> Structures de l'appareil génital femelle d'un insecte (d'après l'Encyclopédie Universalis France S.A. 2005).....	80
<b>Figure 21.</b> Les trois types d'ovarioles retrouvés chez les insectes (d'après l'Encyclopédie Universalis France S.A. 2005).....	81
<b>Figure 22.</b> Elevage de masse d' <i>A. pisum</i> sur jeune plant de <i>Vicia faba</i> . ....	89
<b>Figure 23.</b> Présentation des quatre stades de développement étudiés. ....	91
<b>Figure 24.</b> Détermination de la zone de dissection dans une femelle parthénogénétique vivipare de puceron du pois afin d'isoler les deux ovaires. ....	92
<b>Figure 25.</b> Puce à ADN NimbleGen 4x72K « ACYPI v1.0».....	100
<b>Figure 26.</b> Résumé des étapes de synthèse et de purification des ARN amplifiés. ....	102
<b>Figure 27.</b> Résumé des étapes de synthèse des ADNc double brin utilisés pour la préparation des cibles fluorescentes à hybrider sur la puce à ADN.....	103
<b>Figure 28.</b> Exemples de profils obtenus lors de l'analyse qualité des échantillons utilisés dans cette étude par électrophorèse capillaire.....	105
<b>Figure 29.</b> Récapitulatif des produits de transcription inverse et des pools réalisés pour la réalisation des expériences de RT-PCR en temps réel. ....	112
<b>Figure 30.</b> Résumé des conditions de réalisation des réactions de PCR. ....	115
<b>Figure 31.</b> Organisation de la plaque 96 puits utilisée pour la réalisation des expériences de RT-PCR en temps réel. ....	116
<b>Figure 32.</b> Résumé des conditions de réalisation des réactions de RT-PCR en temps réel.....	117
<b>Figure 33.</b> Résumé des conditions de réalisation des réactions de PCR pour la production des ADN db utilisés pour les expériences d'ARN interférent. ....	120
<b>Figure 34.</b> Résumé des conditions de réalisation des réactions de PCR après clonage des séquences cibles des gènes d'intérêt dans le plasmide PCR 2.1 TOPO.....	121
<b>Figure 35.</b> Milieu artificiel pour l'élevage de pucerons. ....	123
<b>Figure 36.</b> Localisation du point d'injection des ARNdb pour la réalisation des expériences d'interférence par l'ARN.....	124
<b>Figure 37.</b> Organisation de la plaque 96 puits utilisée pour les expériences de RT-PCR en temps réel après injection d'ARNdb.....	126
<b>Figure 38.</b> Comparaison de la composition en acides aminés protéiques entre les embryons de stades différents, le premier stade larvaire et l'adulte. ....	131
<b>Figure 39.</b> Comparaison de la composition en acides aminés libres entre les embryons de stades différents, le premier stade larvaire et l'adulte. ....	132
<b>Figure 40.</b> Composition (mol%) en acides aminés libres des trois milieux de culture testés. ....	134
<b>Figure 41.</b> Suivi de la taille moyenne des embryons tardifs (LE) au cours des 72 h de culture sur milieu GRS (en bleu) et GAp3 (en rouge).....	135
<b>Figure 42.</b> Suivi d'un embryon LE au cours de sa mise en culture dans le milieu GAp3.....	136
<b>Figure 43.</b> Suivi d'embryons IE durant 72 h de culture en milieu GAp3.....	137

<b>Figure 44.</b> Suivi d'embryons EE durant 72 h de culture en milieu GAp3. ....	138
<b>Figure 45.</b> Comparaison de la composition en acides aminés protéiques des embryons LE avant mise en culture (J0) et après trois jours de culture dans les milieux GRS et GAp3....	139
<b>Figure 46.</b> Comparaison des concentrations en acides aminés libres des embryons LE avant mise en culture (J0) et après trois jours de culture (J3) dans les milieux GRS.....	140
<b>Figure 47.</b> Corrélation entre le bilan (J3-J0) des acides aminés libres dans les embryons après culture sur le milieu GRS et la concentration en acides aminés libres du milieu. ....	141
<b>Figure 48.</b> Comparaison des concentrations en acides aminés libres des embryons LE avant mise en culture (J0) et après trois jours de culture (J3) dans le milieu GAp3. ....	142
<b>Figure 49.</b> Corrélation entre le bilan (J3-J0) des acides aminés libres dans les embryons après culture sur le milieu GAp3 et la concentration en acides aminés libres du milieu. ....	143
<b>Figure 50.</b> Groupes de stades de développement analysés dans l'étude transcriptomique et comparaisons réalisées. ....	152
<b>Figure 51.</b> Classification hiérarchique non supervisée des 12 005 gènes les plus variants à l'aide du logiciel MeV .....	153
<b>Figure 52.</b> Diagramme de Venn présentant les 3945 gènes différentiellement exprimés dans les trois comparaisons analysées et leur sens de variation.....	154
<b>Figure 53.</b> Analyse de l'expression des gènes liés au développement chez le puceron de pois...	156
<b>Figure 54.</b> Intensité moyenne d'expression des gènes variant significativement dans au moins une des trois comparaisons réalisées. ....	158
<b>Figure 55.</b> Répartition des gènes variant significativement d'expression au sein de 5 principales classes métaboliques dans le réseau métabolique du puceron du pois. ....	160
<b>Figure 56.</b> Analyse de l'expression des gènes liés à la synthèse et à la dégradation des acides aminés chez le puceron de pois. ....	162
<b>Figure 57.</b> Répartition des gènes appartenant au métabolisme des acides aminés différentiellement exprimés et vue d'ensemble des voies métaboliques sollicitées dans les trois comparaisons analysées dans cette étude. ....	163
<b>Figure 58.</b> Gènes variant significativement d'expression au cours du développement du puceron du pois dans la voie de biosynthèse de la phénylalanine et de la tyrosine. ....	166
<b>Figure 59.</b> Gènes codant pour l'aspartate transaminase dans le génome du puceron du pois.....	167
<b>Figure 60.</b> Représentation de la première moitié des classes fonctionnelles de gènes enrichies en gènes différentiels pour les trois comparaisons EE-IE, IE-LE et LE-L1. ....	169
<b>Figure 61.</b> Analyse de l'expression des gènes liés aux constituants structuraux de la cuticule (classe GO:0042302) chez le puceron de pois. ....	172
<b>Figure 62.</b> Ensemble des réactions conduisant à la production de DOPA et de dopamine chez le puceron du pois et gènes différentiels associés. ....	173
<b>Figure 63.</b> Comparaison des variations du niveau d'expression de deux gènes candidats à la normalisation des données de qRT-PCR pour chacun des stades étudiés.....	175
<b>Figure 64.</b> Confirmation des données des puces à ADN par des expériences de qRT-PCR.....	176

- Figure 65.** Gènes variant significativement d'expression au cours du développement du puceron du pois dans la voie de biosynthèse de la phénylalanine et de la tyrosine et quantification des acides aminés associés à cette voie. .... 180
- Figure 66.** Voie de biosynthèse de la dopamine placée dans le contexte de la symbiose *A. pisum* / *B. aphidicola*. .... 183
- Figure 67.** Evolution de la taille des embryons parthénogénétiques du puceron du pois au cours au cours de leur développement. .... 185
- Figure 68.** Effet de l'injection d'ARN db dans des pucerons au stade L3 : suivi de survie et de fécondité. .... 189
- Figure 69.** Effet de l'administration d'ARN db par voie alimentaire : suivi de survie et de fécondité. .... 190
- Figure 70.** Niveau d'inhibition de l'expression du gène ACYPI007803 suite à l'injection d'ARN db : dosage par RT-PCR en temps réel dans différents compartiments corporels. .... 192

# Liste des Tableaux



<b>Tableau 1.</b> Résumé des résultats d’annotation des gènes du puceron du pois (d’après IAGC, 2010). .....	56
<b>Tableau 2.</b> Composition des différents milieux de culture testés.....	96
<b>Tableau 3.</b> Amorces oligonucléotidiques utilisées pour la réalisation des expériences de RT-PCR en temps réel. ....	114
<b>Tableau 3.</b> Composition du milieu nutritif Ap3. ....	123
<b>Tableau 4.</b> Gènes variant significativement d’expression au sein des classes A) des gènes contenant une homéobox et B) des gènes appartenant à des voies de signalisation. ....	157
<b>Tableau 5.</b> Gènes variant significativement d’expression dans notre jeu de données et appartenant à des cascades d’activation génique se succédant dans le développement des animaux métazoaires. ....	159
<b>Tableau 6.</b> Répartition des gènes différentiellement exprimés dans l’ensemble de nos données parmi les différentes familles biosynthétiques ou de dégradation des acides aminés. ....	164





# Liste des Abréviations

Abréviation	Définition
AAAP	amino acid/auxin permease : transporteurs catalysent le symport d'auxine ou celui d'un ou plusieurs acides aminés au travers des membranes lipidiques
AAL	Acides aminés libres
AAP	Acides aminés protéiques
AAT	Acides aminés totaux
ADN	Acide désoxyribonucléique
ADNc	ADN complémentaire
ADNg	ADN génomique
ANOVA	Analyse de variance (analysis of variance)
APC	amino acid/polyamine/organocation : transporteurs catalysent les transports de type uniport, symport, et antiport d'une large gamme de substrats au travers des membranes lipidiques
ARN	Acide ribonucléique
ARN db	ARN double brins
ARNa	ARN amplifié
ARNm	ARN messenger
Ct	Threshold cycle
DEPC	Pyrocarbonate d'éthyle, aussi nommé diéthyl pyrocarbonate, diéthyl dicarbonate
dNTP	Mélange des quatre désoxyribonucléotides : dATP (désoxy adénine tri-phosphate), dCTP (désoxy cytosine tri-phosphate), dGTP (désoxy guanine tri-phosphate), dTTP (désoxy thymine tri-phosphate)
DO	Densité optique
dsRNA	ARN double brin (double stranded RNA)
dT	Désoxy-thymine
DTT	Dithiothréitol
EDTA	Acide diaminotétracarboxylique (Ethylenediaminetetraacetic acid)
EE	Early embryo (embryon précoce)
EPG	Electrical Penetration Graph
FDR	False Discovery Rate
FMOC	9-fluorénylméthyl chloroformate
GO	Gene Ontology
HPLC	Chromatographie liquide haute performance (High performance liquid chromatography)
IE	Intermediate embryo (embryon intermédiaire)
IPTG	Isopropyl $\beta$ -D-1-thiogalactopyranoside
LE	Late embryo (embryon tardif)
Milieu LB	Bouillon lysogène (Lysogeny broth)
OPA	Ortho-phthalaldéhyde
PCR	Polymerase chain reaction
PEG	Polyéthylène glycol
qRT-PCR	RT-PCR quantitative
RNAi	ARN interférent
RT	Reverse transcription
RT-PCR	Reverse transcription-PCR
siRNA	Petits ARN interférent (small interfering RNA)
SVF	Sérum de veau foetal

TAE	Tris-acétate
TCA	Acide trichloroacétique (Trichloroacetic acid)
Tris	Trishydroxyméthylaminométhane (= 2-amino-2-hydroxyméthyl-1,3-propanediol)
UV	Ultraviolet
X-Gal	5-bromo-4-chloro-3-indolyl-beta-D-galactopyranoside (C <sub>14</sub> H <sub>15</sub> BrClNO <sub>6</sub> )

# Avant-propos

---

Le puceron du pois *Acyrtosiphon pisum* est un ravageur notable des cultures en régions tempérées. En effet, cet insecte s'attaque à de nombreuses légumineuses d'intérêt agronomique (pois, fève, lentille, luzerne, trèfle) et se nourrit de leur sève phloémienne détournant ainsi à son profit les éléments nutritifs nécessaires à la croissance des plantes. Or, bien que la sève élaborée présente de fortes teneurs en sucres, et contienne des substances inorganiques et certains acides aminés non-essentiels, elle constitue une ressource limitée en acides aminés essentiels (non synthétisables par les animaux) et en vitamines (Douglas, 2003). L'adaptation du puceron à cette source alimentaire déséquilibrée n'a pu se faire que grâce à une symbiose obligatoire avec une bactérie proche d'*Escherichia coli* et spécialisée dans la complémentation nutritionnelle : *Buchnera aphidicola* (Baumann, *et al.*, 1995).

La relation symbiotique entre le puceron du pois et *Buchnera aphidicola* est l'un des modèles de symbiose le plus étudié à un niveau biologique. Il s'agit d'une symbiose intracellulaire obligatoire où la bactérie est hébergée dans des cellules spécialisées de l'hôte, les bactériocytes (Baumann, 2005). Le fonctionnement de cette association ne peut pas être étudié en considérant l'hôte et son symbiote comme deux systèmes additifs et communicant dans une même superstructure. En effet, l'association entre *B. aphidicola* et son hôte est si fortement intégrée, que le puceron ne peut pas se développer correctement ni se reproduire sans la bactérie (Douglas, 1996). A l'inverse, la bactérie n'est pas cultivable *in vitro* (Darby, *et al.*, 2006). Cette dépendance stricte est intimement liée à l'histoire évolutive du couple, qui a débuté il y a environ 150 millions d'années et a abouti à une parfaite complémentarité des deux partenaires sur les plans génomique, biochimique, métabolique et fonctionnel. En 1985, l'UMR INRA-INSA de Lyon « Biologie Fonctionnelle Insectes et Interactions » (BF2I), notamment au travers des études initiées par Gérard Febvay et Yvan Rahbé, a commencé à s'intéresser aux interactions trophiques qui lient les deux partenaires du couple symbiotique *A. pisum* / *B. aphidicola*. De nombreuses études métaboliques et biochimiques conduites sur milieu artificiel en conditions contrôlées ont ainsi montré que *B. aphidicola* fournit au puceron les acides aminés essentiels à son développement larvaire lorsque ceux-ci sont absents de son alimentation (Febvay, *et al.*, 1995 ; Febvay, *et al.*, 1999 ; Liadouze, *et al.*, 1995 ; 1996).

Dans les années 2000, suite à la publication du séquençage du génome du symbiote du puceron *A. pisum* (Shigenobu, *et al.*, 2000), les études génomiques et fonctionnelles sur cette bactérie symbiotique ont débuté. Depuis, les génomes des symbiotes associés à 4 autres espèces de pucerons (Lamelas, *et al.*, 2011 ; Perez-Brocal, *et al.*, 2006 ; Tamas, *et al.*, 2002 ; van Ham, *et al.*, 2003) et à différentes souches du puceron du pois (Moran, *et al.*, 2009) ont été séquencés et annotés. Les données génomiques ont montré que les symbiotes de pucerons sont tous caractérisés par de très petits génomes spécialisés dans la production d'acides aminés essentiels, confortant ainsi les résultats obtenus dans les études métaboliques. En complément des approches métaboliques et nutritionnelles, la caractérisation de l'organisation du génome et du transcriptome de la bactérie a alors été entreprise dans l'UMR BF2I, grâce au développement de la première puce à ADN à oligonucléotides dédiée au génome de *B. aphidicola* par Federica Calevro, Hubert Charles et Jean-Michel Fayard (Calevro, *et al.*, 2004). Cette puce a été utilisée pour analyser la réponse transcriptomique globale de *B. aphidicola* à des stress nutritionnels imposés à l'hôte (Charles, *et al.*, 2006 ; Reymond, *et al.*, 2006) ou encore pour déterminer les propriétés structurales du génome de la bactérie et son réseau génétique (Brinza, *et al.*, 2009 ; Brinza, *et al.*, 2010 ; Viñuelas, *et al.*, 2007).

L'ensemble de ces recherches a conduit à une meilleure compréhension du rôle de la bactérie dans la physiologie du puceron, mais a également montré les limites de l'étude de l'un des deux partenaires symbiotiques dans une symbiose aussi intégrée. Le séquençage et l'annotation récents du génome de puceron de pois (IAGC, 2010) ont permis le développement d'outils d'analyse globale dédiés au génome des deux partenaires, ouvrant ainsi la voie à des études couplant les approches de biologie et physiologie classique aux analyses génomiques sur grande échelle, afin d'approfondir les bases moléculaires de cette symbiose. L'UMR BF2I participe activement au déploiement de ces outils, grâce notamment au développement, par Stefano Colella, de la première puce à oligonucléotides dédiée au génome du puceron *A. pisum*.

En profitant du développement de ces outils et en continuité avec les travaux menés dans l'UMR BF2I, mon travail de thèse a eu comme objectif d'analyser les bases moléculaires des échanges trophiques entre *B. aphidicola* et le puceron du pois afin de caractériser des voies métaboliques et des gènes clé dans cette symbiose en étudiant en parallèle la bactérie symbiotique et son insecte hôte. Si la plupart des études moléculaires et métaboliques sur cette symbiose se sont concentrées sur l'analyse des réponses des stades larvaires et adultes de l'insecte, dans mon travail je me

suis plus particulièrement intéressée à l'étude du développement embryonnaire parthénogénétique chez le puceron du pois. En effet, si ce dernier est reconnu pour être un important ravageur des cultures, c'est aussi en raison de son fort potentiel reproductif lors de son cycle de reproduction par parthénogenèse. De plus, des études sur les embryons ont suggéré que la demande en acides aminés essentiels des tissus embryonnaires est plus importante que celle des tissus adultes et larvaires et que le compartiment embryonnaire serait le compartiment corporel le plus dépendant de la symbiose avec *B. aphidicola* (Douglas, 1996). Ces études restent rares, à cause de la difficulté à isoler les embryons de pucerons et du manque de protocoles adaptés à leur mise en culture. Ainsi, mon travail de thèse est l'une des premières études à avoir analysé la physiologie nutritionnelle de la symbiose avec *B. aphidicola* au cours du développement embryonnaire du puceron du pois.

Après une première partie introductive présentant le modèle puceron et son importance agronomique, la symbiose avec *B. aphidicola* en relation avec les besoins nutritionnels ainsi que la reproduction et le développement de cet insecte, ce manuscrit présente les méthodes que nous avons utilisées et/ou développées dans le cadre de ce travail (notamment l'isolement et la mise en culture d'embryons de puceron, la quantification de leur pool d'acides aminés et l'analyse de leur transcriptome). La partie Résultats se compose de trois volets majeurs illustrant les trois approches utilisées dans cette étude. Pour chacun de ces trois volets, la présentation des Résultats est accompagnée d'une discussion spécifique. La première partie des Résultats présente l'étude métabolique conduite afin de déterminer les besoins en acides aminés de différents stades du développement embryonnaire et larvaire du puceron du pois et d'identifier des voies clé de l'association symbiotique au cours du développement du puceron du pois. Le deuxième volet présente la caractérisation du transcriptome au cours du développement embryonnaire et larvaire précoce chez le puceron du pois. Cette étude m'a permis d'identifier des gènes clé dans la symbiose avec *B. aphidicola* et/ou dans les passages entre différents stades du développement. Enfin, le troisième volet de mes Résultats présente l'approche développée dans la dernière partie de ma thèse, qui a consisté en une analyse fonctionnelle du rôle de l'un des gènes dont l'importance a été mise en évidence par les approches métabolique et transcriptomique. Nous avons pour cela perturbé l'expression de ce gène par la technique d'ARN interférence (RNAi) et avons évalué le niveau d'inhibition du gène et les effets de cette inhibition sur la survie et la fécondité des pucerons. Enfin, une conclusion générale et les perspectives de ce travail de recherche sont proposées en fin de ce manuscrit.



# Partie I - Introduction





# 1 Les pucerons et leur importance agronomique

## 1.1 Cycle de vie des pucerons

## 1.2 Mode d'alimentation

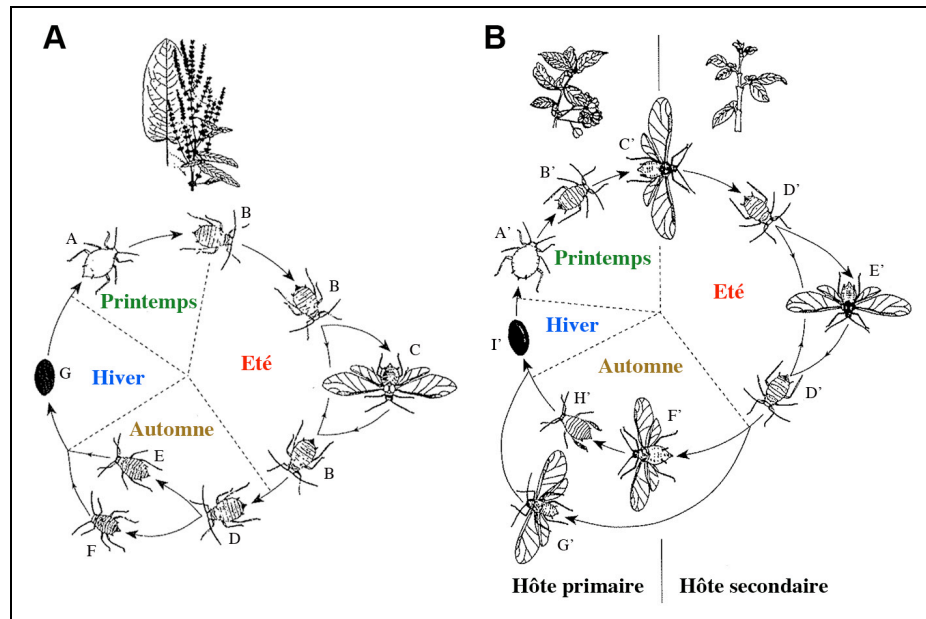
## 1.3 Impacts sur les plantes

Les pucerons appartiennent à l'ordre des Hémiptères et forment avec les aleurodes, les cochenilles et les psylles, le sous-ordre des Sternorrhyncha. Dans celui-ci, le groupe des Aphidomorpha, qui regroupe l'ensemble des pucerons (*lato sensu*), est divisé en trois super-familles, les Canadaphidoidea (taxon éteint, seulement représenté par des espèces fossiles), les Phylloxeroidea et les Aphidoidea, à laquelle appartient la famille des Aphididae (les pucerons *stricto sensu*). Cette famille comprend plus de 4300 espèces dont 600 en France et tous ses représentants se nourrissent spécifiquement de sève phloémienne (Blackman, *et al.*, 1994 ; 2000). Les pucerons sont parmi les principaux ravageurs des cultures en région tempérée. En effet, une espèce végétale sur quatre, dont la quasi-totalité des espèces agricoles, est attaquée par les pucerons (Dixon, 1998). Je débiterai ainsi ma synthèse bibliographique en développant les différentes raisons qui font des pucerons de si redoutables ravageurs des cultures.

---

## 1.1 Cycle de vie des pucerons

Le cycle de vie des pucerons témoigne de l'étonnante plasticité adaptative de ce groupe d'insectes, caractère qui contribue de manière considérable à leur succès en tant que ravageurs de plantes. Les pucerons peuvent être divisés en deux groupes en fonction de leur cycle de vie : i) les espèces dites monœciques qui se nourrissent sur les mêmes espèces de plantes vivaces ou herbacées tout au long de l'année (Figure 1A) ; et ii) les espèces dites diœciques ou hétéroœciques qui, au cours de leur cycle biologique, changent d'hôte et migrent d'un hôte primaire (souvent des plantes ligneuses, en hiver) vers une ou plusieurs espèces secondaires (telles des plantes herbacées durant l'été) (Figure 1B) (Dixon, 1998). Seulement environ 10 % des espèces de pucerons sont diœciques (Eastop, 1986), mais certaines d'entre elles, comme *Aphis fabae* et *Myzus persicae* se retrouvent en abondance dans la nature. La migration des colonies de pucerons d'une plante hôte à l'autre est facilitée par la production de formes ailées à la fin du printemps et durant l'automne.



**Figure 1. Cycles annuels de vie des pucerons avec alternance ou non de plantes hôtes (d'après Dixon 1998).**

**A)** Cycle monœcique du puceron du rumex, *Aphis rumicis*. Les individus représentés sont : (A) la femelle fondatrice, (B) les formes aptères parthénogénétiques, (C) la forme ailée parthénogénétique, (D) la sexupare, (E) la femelle sexuée, (F) le mâle, et (G) l'œuf.

**B)** Cycle diœcique du puceron de la fève, *Aphis fabae*. Les individus représentés sont : (A') la femelle fondatrice, (B') la fondatrigène, (C') la forme ailée migrante de printemps, (D') les formes aptères parthénogénétiques, (E') la forme ailée parthénogénétique, (F') la forme gynopare migrante d'automne, (G') la femelle sexuée, (H') le mâle, et (I') l'œuf.

Au cours d'un cycle annuel de vie, les pucerons d'une même espèce, voire d'un même clone, peuvent compter de nombreuses formes ou morphes. Ces différentes morphes coexistent dans une colonie de pucerons et les différences que l'on observe entre elles peuvent avoir une origine génétique ou être induites par les conditions environnementales. Je ne traiterai ici que du deuxième cas, celui du polyphénisme, qui est l'étonnante capacité des pucerons à donner vie à des individus ayant le même génotype, mais des phénotypes différents en réponse à des conditions environnementales variées.

### 1.1.1 Polyphénisme de reproduction

L'une des caractéristiques qui rend les pucerons si fascinants est leur fabuleuse capacité d'alterner reproduction sexuée et reproduction parthénogénétique à partir d'individus ayant le même fond génétique. On parlera alors de polyphénisme de reproduction. En règle générale, les pucerons ont un cycle de reproduction annuel hétérogonique impliquant une

alternance de plusieurs générations parthénogénétiques (absence d'accouplement) et une seule génération sexuée (Moran, 1992 ; Simon, *et al.*, 2002). C'est le cas par exemple du cycle monœciques du puceron du pois *Acyrtosiphon pisum* avec, au printemps, l'éclosion des œufs issus de la reproduction sexuée et déposés avant l'hiver par des femelles aptères sexuées, donnant ainsi naissance à des larves qui, une fois adultes, se multiplient par parthénogénèse (Figure 2). Ces femelles, appelées fondatrices, sont vivipares et donnent naissance à une centaine de larves (premier stade larvaire : L1) en l'espace de quelques jours. Tous les pucerons issus d'une femelle fondatrice sont des femelles asexuées génétiquement identiques se reproduisant par parthénogénèse. Ces larves seront également vivipares au stade adulte et portent déjà en elles les futures générations d'embryons qui ont commencé à se développer alors que les larves étaient encore dans l'abdomen de leur mère. On parle alors du télescopage des générations (Dixon, 1992). Au cours du printemps et de l'été, plus d'une douzaine de générations sont ainsi produites par parthénogénèse (Simon, *et al.*, 2007). La génération sexuée est générée à la fin de l'été en réponse à la diminution de la durée des jours (cf. §3.2 p 68). Les femelles parthénogénétiques donnent alors naissance à des « sexupares » (femelles pré-sexuées) qui produisent des femelles et des mâles qui vont s'accoupler pour donner les œufs d'hiver. Ces œufs sont résistants au froid, et restent en diapause durant tout l'hiver pour n'éclore qu'au printemps et donner de nouvelles fondatrices. La reproduction sexuée permet non seulement de produire des œufs résistants aux conditions climatiques de l'hiver mais également de générer des populations avec de nouvelles combinaisons de génotypes, sur lesquelles la sélection naturelle opère, en évitant ainsi l'accumulation de mutations délétères (Simon, *et al.*, 2003).

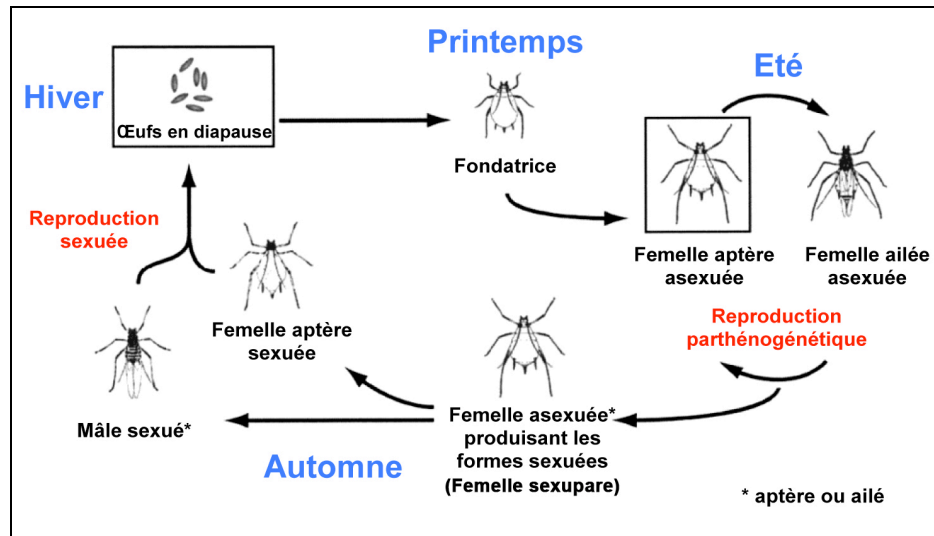
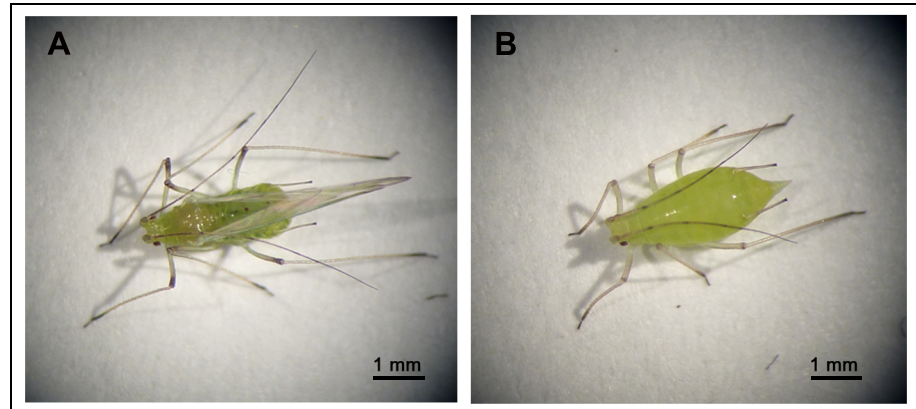


Figure 2. Cycle de vie du puceron du pois *Acyrtosiphon pisum* illustrant le mode de reproduction (parthénogénétique ou sexué) en fonction des saisons (d'après Miura *et al.* 2003).

### 1.1.2 Formes ailées et aptères

Un second polyphénisme communément rencontré chez les pucerons correspond à la présence, dans une même colonie, d'individus ailés et d'individus non-ailés (aptères) qui ont strictement le même génome (Figure 3). Les morphes ailés et aptères diffèrent également par une série de traits, comme leur équipement sensoriel (plus fourni chez les ailés), la durée de leur développement (plus longue chez les ailés), ainsi que leur fécondité (plus faible chez les ailés) (Simon, 2007a). Chez les pucerons, les ébauches d'aile semblent présentes dans tous les embryons, sans tenir compte qu'ils se développent en adultes ailés ou aptères (Johnson, 1958 ; Johnson, *et al.*, 1960 ; Tsuji, *et al.*, 1987). Ce caractère montre l'ancestralité du phénotype ailé, qui constitue ainsi la voie de développement par défaut des pucerons (Johnson, *et al.*, 1960). Jusqu'au troisième ou quatrième stade larvaire, il est impossible de distinguer les deux morphes par une simple observation. Des analyses histologiques révèlent que les deux morphes possèdent des ébauches d'ailes au premier stade larvaire. Ces ébauches dégèrent au cours du second stade larvaire chez les formes non-ailées (Ishikawa, *et al.*, 2008).



**Figure 3. Formes ailées et aptères du puceron *Acyrtosiphon pisum*.**

A) Puceron parthénogénétique aptère adulte.

B) Puceron parthénogénétique ailé adulte.

Les conditions environnementales pouvant influencer la production de formes ailées ont grandement été étudiées (Braendle, *et al.*, 2006 ; Müller, *et al.*, 2001). Chez les pucerons, comme cela est observé chez d'autres insectes, la densité de la population est le paramètre primordial qui détermine le phénomène de dispersion. Ainsi l'augmentation de la densité de pucerons entraînera l'apparition de formes ailées, la sensibilité à ce facteur étant toutefois dépendante de l'espèce (Bonnemaison, 1951 ; Johnson, 1965 ; Lees, 1967 ; Shaw, 1970 ; Sutherland, 1969a ; b). Il semblerait que ce ne soit pas le nombre de pucerons en tant que tel qui favorise la formation d'individus ailés, mais l'intensité des contacts physiques entre congénères, contacts qui sont favorisés par une forte densité de population. Ainsi d'autres facteurs, comme la présence d'ennemis naturels, induisant la production de phéromones d'alarme émises par les pucerons en cas de danger et en accroissant le nombre de contacts au sein d'une colonie, stimulent aussi la production d'ailés (Braendle, *et al.*, 2006 ; Simon, 2007a). La qualité nutritive de la plante hôte ou encore les changements de température influencent également, mais de façon plus limitée, la production des formes ailées dans une population de pucerons (Simon, 2007a).

Très peu de choses sont connues à l'heure actuelle sur les mécanismes capables d'orienter le développement des pucerons vers la production de formes ailées ou aptères. Les facteurs environnementaux contrôlant l'apparition des ailes interviendraient sur le système neuro-endocrine de l'insecte et différents auteurs évoquent un rôle important de l'hormone juvénile dans ce processus, bien que ceci ne soit pas encore caractérisé au niveau moléculaire (Braendle, *et al.*, 2006 ; Simon, 2007a). En aval de ce système de perception / transduction du signal, les gènes cibles commencent juste à être caractérisés chez la larve. Dans une étude

récente, Brisson et collaborateurs (2010) ont suivi, au cours du développement larvaire du puceron du pois, l'expression de 11 gènes homologues à ceux connus pour être à la base du développement des ailes chez la drosophile, en comparant de futurs individus aptères et ailés. Cette étude a permis d'identifier un premier gène candidat spécifique d'un développement orienté vers un phénotype ailé. Ce gène dénommé *apterous1* (*ap1*) est significativement plus exprimé dans les morphes ailées comparativement aux morphes non ailées pendant le premier et deuxième stade larvaire.

---

### 1.1.3 Autres polyphénismes

D'autres polyphénismes sont recensés chez les pucerons, tels que la présence de larves soldats chez des espèces sociales organisées en castes. C'est le cas pour une cinquantaine d'espèces réparties dans deux familles taxonomiquement proches, les *Pemphigidae* et les *Hormaphididae*. Chez le puceron *Colophina arma* (famille Penphigidae) par exemple, les femelles parthénogénétiques produisent deux types de larves : des larves qui se développeront pour donner des adultes se reproduisant par parthénogénèse et des larves soldats dont le développement s'arrête au dernier stade larvaire et dont les pattes antérieures et médianes sont renforcées en forme de pinces (Simon, 2007b).

Il existe également un important polyphénisme de coloration chez les pucerons. C'est le cas des variations de couleur intramorphique, qui sont d'ordinaire induites par des facteurs environnementaux et sont réversibles. Parmi ces facteurs environnementaux, on retrouve les variations de température ou d'intensité lumineuse. Par exemple, la forme rouge du puceron *S. avenae* produit une progéniture verte, ou de couleur intermédiaire, lorsqu'elle est soumise à de courtes périodes d'éclairage et à faible intensité (Markkula, *et al.*, 1967). La couleur des insectes est une caractéristique importante dans les relations prédateur-proie : chez le puceron du pois, notamment, il a été montré que les coccinelles consomment plutôt les pucerons roses alors que les guêpes parasitoïdes attaquent de préférence les pucerons verts (Tsuchida, *et al.*, 2011). Dans bien des cas, un même phénotype alternatif est exprimé comme polyphénisme contrôlé par l'environnement dans une certaine espèce et comme un polymorphisme génétiquement contrôlé dans une autre l'espèce étroitement liée (Nijhout, 1999). Aussi, un phénotype semblable peut être déterminé par l'environnement ou par la variation d'un seul locus. Les mécanismes de variation de couleur chez les pucerons ont tout d'abord été étudiés par Müller (Müller, 1962 ; 1979 ; 1987). Sa conclusion générale

était que les variations de couleur liées à la génétique reposaient sur la présence sur une seule paire d'allèles, le rose dominant par exemple sur le vert chez le puceron du pois (Müller, 1962). Il semblerait également que ce locus puisse être lié au chromosome X chez le puceron (Caillaud, *et al.*, 2010 ; Müller, 1987).

Enfin, il a été récemment montré que l'infection d'*A. pisum* par une bactérie endosymbiotique facultative appartenant au genre *Rickettsia* est susceptible d'intervenir sur la synthèse des pigments conférant au puceron du pois sa couleur, en provoquant des changements de coloration du rose au vert dans des populations naturelles (Tsuchida, *et al.*, 2011).

Bien que ces différents aspects de polyphénisme soient connus depuis longtemps chez les pucerons, de nombreuses études récentes cherchent à caractériser, notamment chez *A. pisum*, les bases moléculaires à l'origine de ces phénomènes grâce au récent séquençage de son génome (IAGC, 2010).

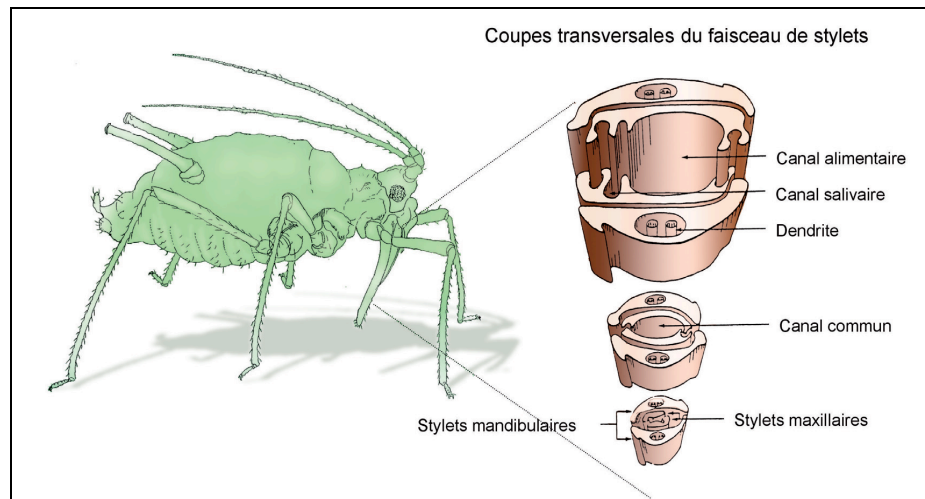
---

## 1.2 Mode d'alimentation

Le succès des pucerons en tant que ravageurs des cultures est également lié à leur capacité à exploiter comme unique source alimentaire la sève élaborée des plantes. Or, la sève circulant dans les vaisseaux du phloème, les pucerons ont développé toute une série d'adaptations anatomiques et morphologiques, parmi lesquelles des pièces buccales hautement modifiées, leur permettant d'exploiter cette ressource trophique difficilement accessible. Les pièces buccales des pucerons forment un faisceau de quatre stylets flexibles : deux stylets mandibulaires et deux stylets maxillaires principalement constitués de chitine. Les stylets mandibulaires entourent et protègent les stylets maxillaires (Figure 4) (Brault, *et al.*, 2007 ; Douglas, 2003). Ces derniers possèdent une architecture complexe sur leur face interne qui présente des invaginations et excavations complémentaires assurant une coaptation sur toute la longueur et ménageant l'existence de deux canaux, un canal alimentaire (1-2  $\mu\text{m}$  de diamètre, conduisant la nourriture aspirée des cellules végétales au tube digestif) et un canal salivaire (0,2-0,4  $\mu\text{m}$  de diamètre, conduisant la salive expulsée par les glandes salivaires jusque le stylet pénètre dans la plante). Ces canaux sont séparés sur presque toute la longueur des stylets et fusionnent en un canal commun à l'extrémité du faisceau (Figure 4) (Brault, *et al.*, 2007). Lorsque le puceron ne se nourrit pas, les stylets sont enfermés dans le labium (ou proboscis). Les pucerons ne possédant pas de palpes maxillaires et labiaux, mécanoréception ou chémoréception sont alors réalisées grâce à des



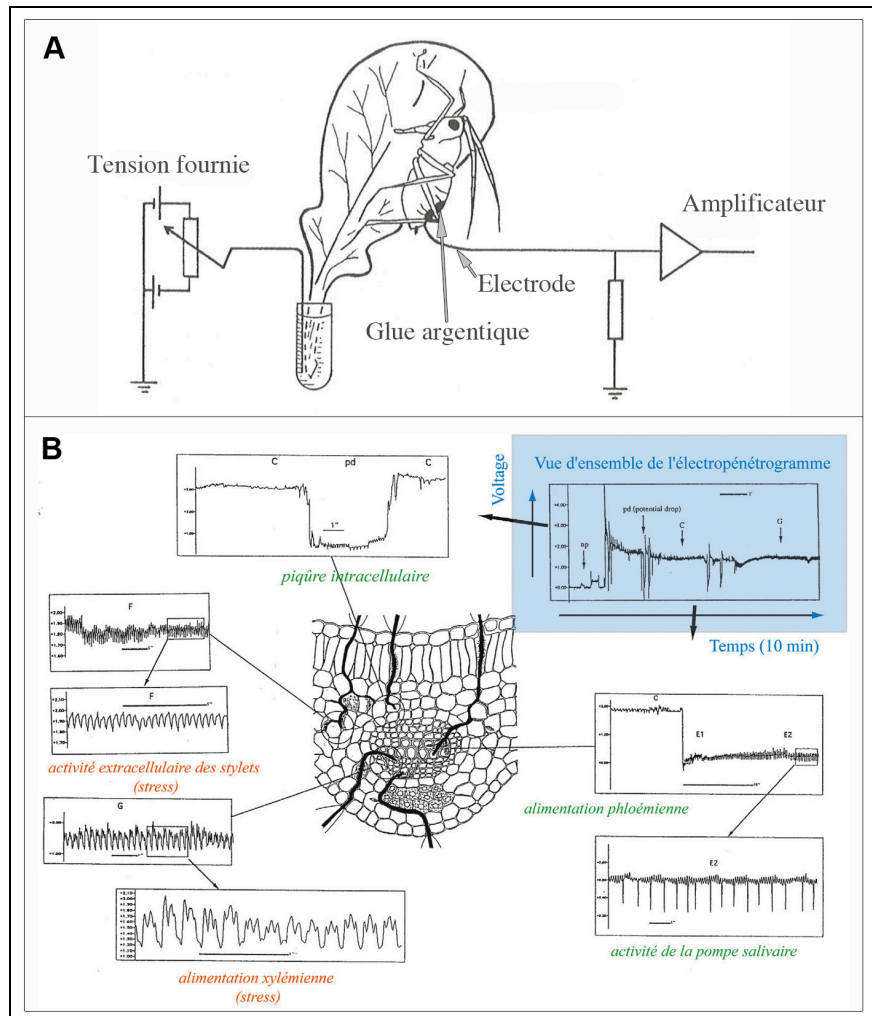
sensilles localisées à l'extrémité du labium ou au sein de l'organe épipharyngial gustatif. Les pucerons balayent à l'aide de leur labium la surface de la plante pouvant être un hôte potentiel. Ce sont les récepteurs tactiles localisés à l'extrémité du labium qui permettent au puceron de détecter la zone préférentielle de piqure.



**Figure 4. Détail des pièces buccales des pucerons (d'après Brault *et al.*, 2007).** Le faisceau des deux stylets mandibulaires et des deux stylets maxillaires forme 2 canaux séparés (alimentaire et salivaire) qui fusionnent en un canal commun à son extrémité.

Le suivi *in situ* des activités alimentaires des pucerons a pu être réalisé grâce à la technique d'électropénétrographie (EPG : Electrical Penetration Graph) (McLean, *et al.*, 1964 ; Tjallingii, 1978 ; 1986). Son principe repose sur l'intégration du puceron et de sa plante hôte dans un circuit électrique (Figure 5A). La pénétration des pièces buccales de l'insecte dans les différents tissus végétaux s'accompagne de modifications des caractéristiques électriques de ce circuit qui sont détectées au moyen d'un amplificateur approprié (Figure 5B). Cette technique couplée à celle de la stylectomie (coupure du stylet qui reste en place dans les tissus végétaux après piqure et analyse de son contenu) a permis de montrer qu'au cours de la pénétration du stylet dans la plante, le puceron réalise divers prélèvements extracellulaires mais également des ponctions intracellulaires dans des tissus non-nourriciers (Giordanengo, *et al.*, 2007). Ces prélèvements permettent au puceron de choisir sa plante hôte (Powell, *et al.*, 2006) et le renseignent sur la localisation de ses stylets dans les tissus végétaux. Ces diverses activités sont toujours accompagnées d'injection de salive. C'est au cours de la phase dite d'échantillonnage qu'est effectué le plus grand nombre de pénétrations dans les cellules bordant les vaisseaux phloémiens. Ce comportement tend à supposer que l'insecte est capable de

reconnaître la composition chimique (pH, teneur en certains sucres et acides aminés...) des différents types cellulaires rencontrés (Rahbé, *et al.*, 2000).



**Figure 5. Suivi *in situ* des activités alimentaires d'un puceron par la technique d'électropénétrographie (EPG).**

**A)** Schéma d'un puceron introduit au sein d'un circuit électrique afin d'enregistrer les changements de potentiel électrique lorsque le stylet du puceron pénètre les différents tissus de la plante (d'après Dixon, 1998).

**B)** Exemple de graphes d'EPG (d'après Giordanengo *et al.*, 2007). En bleu, un enregistrement global. Au centre, une coupe transversale de feuille, avec l'emplacement des stylets et des liens sur les vues élargies des ondes enregistrées à chacune de ces localisations. Les ondes « C » constituent les trajets extracellulaires, les « E » signent l'alimentation phloémienne et les « pd » (pour potential drop, ou chute de potentiel) accompagnent le franchissement d'une membrane cellulaire en activité. En vert sont représentées des activités normales, en rouge des activités signalant des stress locaux, mécaniques (F) ou trophiques (G).

La sève est suffisamment sous pression pour envahir le canal alimentaire du stylet comme ceci a été mis en évidence par stylectomie avec la sève exsudant par l'extrémité libre du stylet ainsi sectionné. Le puceron contrôle la vitesse d'ingestion de la sève phloémienne (Ponsen, 1987) grâce à une valve pharyngienne. Inversement si la pression n'est pas assez élevée, une pompe pharyngienne permet d'aspirer la sève.

La quantité de nourriture ingérée est déterminée par la durée et la vitesse d'ingestion durant chaque période d'alimentation. Les pucerons se nourrissent le plus souvent continuellement sur les mêmes éléments phloémiens et durant une longue période. Le taux d'alimentation des pucerons croît avec la taille du corps, que ce soit au cours du développement larvaire (Febvay, *et al.*, 1999) ou en fonction de l'espèce de pucerons (Dixon, 1998). Le taux d'ingestion varie également en fonction de la composition en nutriments de la nourriture ingérée. La présence de saccharose et de méthionine pouvant jouer le rôle de phagostimulants (Mittler, *et al.*, 1965). De plus, les pucerons se nourrissant sur milieu dilué semblent compenser en augmentant le taux d'alimentation pour obtenir la même quantité d'éléments nutritifs. Ce phénomène compensatoire a été décrit chez *M. persicae* et *A. pisum* sur milieux artificiels contenant peu de saccharose (Abisgold, *et al.*, 1994 ; Mittler, *et al.*, 1991). Chez *A. pisum*, l'augmentation du taux d'ingestion ne compense que partiellement les faibles concentrations en nutriments, on observe ainsi une plus faible quantité de saccharose ingérée lorsque celui-ci est à faible concentration dans le milieu nutritif. Ce phénomène de compensation nutritionnelle est également observé pour certaines concentrations en acides aminés ne dépassant pas 250 mM (Abisgold, *et al.*, 1994 ; Prosser, *et al.*, 1992a).

---

### 1.3 Impacts sur les plantes

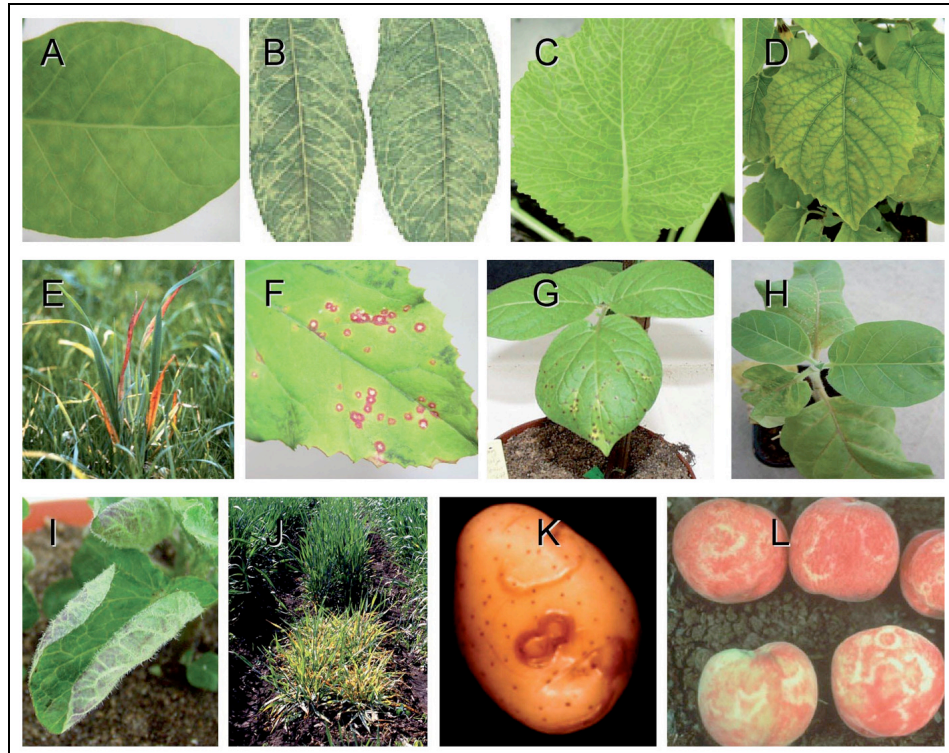
La nature et l'étendue des dégâts causés par l'infestation de pucerons varient largement en fonction des espèces de pucerons et du type de plantes. Même si les pucerons laissent moins de traces visibles de leur infestation que les insectes phytophages en général, néanmoins, ils ne causent pas moins de changements physiologiques profonds chez leurs hôtes (Girousse, *et al.*, 2005) notamment en détournant les ressources de la plante. Les conséquences en sont : une réduction de la croissance de la plante, des graines et des fruits de taille plus petite et de forme bosselée, voire même l'avortement des fruits (Dedryver, 2007 ; Douglas, 2003). Lorsque les pucerons sont très nombreux, la production de miellat (excrétion des pucerons riche en sucre) est tellement importante qu'elle peut recouvrir la zone d'infestation et entraîner le dessèchement de cette

zone. Ce miellat sert également de substrat sur lequel se développent des champignons pulvérulent, les fumagines (Dedryver, 2007).

Alors que le trajet du stylet dans la plante est essentiellement intercellulaire, les pucerons endommagent toutefois la plante au point de piqûre. Ces dommages sont principalement dus à l'injection de salive qui contient de nombreuses enzymes telles que des oxydases, des peptidases et des cellulases (Miles, 1999). La salive peut également contenir, en quantité variable selon les espèces, des dérivés de tryptophane et en particulier de l'acide indole-3-acétique (AIA), qui est une hormone de croissance végétale. La découverte de ce composé (Miles, 1989) chez des pucerons formant des galles végétales permet une explication partielle du processus de formation de celles-ci. Ainsi, la piqûre de certaines espèces de pucerons entraîne des perturbations dans le processus de multiplication cellulaire autour du point de piqûre (Dedryver, 2007). On dénombre ainsi plus de 400 espèces de pucerons formant des galles. Cet exemple de dommage montre bien la capacité des pucerons à modifier la physiologie de la plante hôte (Blackman, *et al.*, 1994 ; Wool, 2004). La formation de galles, tout comme le repliement des feuilles, permettent aux pucerons d'être abrités mais compromettent la croissance et le développement de la plante.

L'injection de salive est également à l'origine de la transmission de maladies virales ou parasitaires (Powell, 2005). Les pucerons constituent ainsi le plus important groupe d'insectes vecteurs de virus phytopathogènes, en transmettant au moins 275 virus (Nault, 1997). Ceci représente 28 % des virus de plantes connus à ce jour. C'est au cours des différentes phases d'alimentation du puceron (pénétration des stylets à la recherche de la sève phloémienne et alimentation *stricto sensu*) que ce dernier acquiert ou dépose les particules virales. Le devenir de ces particules dans le corps des pucerons dépend des virus considérés (Blanc, 2004 ; Gray, *et al.*, 1999): soit les virus effectuent un circuit complexe, depuis la lumière du tube digestif jusqu'aux glandes salivaires, dans le corps de l'insecte (virus circulants) ; soit ils s'accrochent aux stylets du vecteur et sont inoculés lors de la pénétration du stylet dans une nouvelle plante sans que ceux-ci n'aient cheminé à l'intérieur du puceron (virus non-circulants). Les virus se multiplient aux dépens de leur plante hôte en utilisant leur machinerie cellulaire entraînant de nombreuses conséquences sur cette dernière. En effet, la présence et le développement de ces agents infectieux perturbent très souvent les processus physiologiques impliqués dans la production et le renouvellement de composés végétaux, ainsi que dans les échanges entre les différents tissus et organes de la plante (Brault, *et al.*, 2007). Les symptômes visibles de ces perturbations physiologiques varient en intensité et en importance selon le couple plante/virus considéré

(Figure 6). D'importantes pertes de rendement et une altération de la qualité des produits végétaux comme les fruits sont les conséquences économiques de ces infestations.



**Figure 6. Symptômes viraux chez les plantes (d'après Brault *et al.*, 2007).**

Symptômes de différentes mosaïques (A-C), jaunisse (D), rougissement (E), lésions locales nécrotiques (F et G), nécroses des nervures (H), enrroulement des feuilles avec nécroses superficielles d'organe (I), et nanisme (J). Symptômes sur tubercule (K) et fruits (L). A et H : Tabac ; B : Prunier ; C : Navet ; D, G et I : Pomme de terre ; E : Avoine ; F : Chénopode ; J : Orge ; K : Tubercule de pomme de terre ; L: Pêche. A, F, G, H K : Virus Y de la pomme de terre ; D et I : Virus de l'enroulement de la pomme de terre ; E et J : Virus de la jaunisse nanisante de l'orge.

Ainsi, de par leurs dégâts directs qui correspondent à la simple prise de nourriture (action spoliatrice par prélèvement de sève) ou leurs dégâts indirects (développement de champignons saprophytes sur le miellat ou transmission de virus phytopathogènes), les pucerons constituent probablement le groupe des insectes le plus important d'un point de vue agronomique (Dixon, 1998). Cette nuisibilité est d'autant plus importante qu'ils ont un potentiel biotique prodigieux et que leur cycle complexe et leur polyphénisme leur permettent d'exploiter leurs plantes hôtes au maximum, tout en répondant très rapidement aux modifications de l'environnement.

## 2 La physiologie nutritionnelle des pucerons : le couple *Buchnera*/puceron

### 2.1 Composition de la sève phloémienne

### 2.2 La bactérie symbiotique *Buchnera aphidicola*

### 2.3 Le génome de *Buchnera aphidicola*

### 2.4 Le génome du puceron du pois

### 2.5 Les études nutritionnelles

La plupart des insectes ayant une alimentation déséquilibrée possèdent des micro-organismes symbiotiques qui leur apportent les nutriments déficients indispensables (Trager, 1970). Dès 1921, Paul Buchner avait déjà formulé l'hypothèse nutritionnelle pour les symbiotes intracellulaires obligatoires des insectes « *les endosymbioses doivent d'une certaine façon avoir une cause écologique, leur existence est généralement liée à un milieu nutritionnel déséquilibré* ».

Les pucerons appartiennent à l'ordre des Hémiptères, seul groupe d'insectes capable d'utiliser la sève phloémienne des plantes comme unique ou prédominante source de nourriture. Toutes ces espèces d'Hémiptères, qui exploitent une source trophique particulière, possèdent des micro-organismes transmis verticalement (de la mère à la descendance). Chez les sous-ordres Sternorrhyncha (pucerons, aleurodes, cochenilles et psylles) et Auchenorrhyncha (cicadelles), les micro-organismes sont intracellulaires et restreints à des cellules spécialisées. Alors que chez les Hétéroptères (punaises), les symbiotes sont hébergés dans des diverticules spécialisés de l'intestin (Buchner, 1965b ; Douglas, 1989).

Ces micro-organismes sont connus pour avoir un rôle physiologique important dans l'adaptation de leur insecte hôte à la plante. C'est tout particulièrement le cas des pucerons, pour lesquels les interactions plantes / insectes / micro-organismes sont les mieux caractérisées d'un point de vue physiologique.

---

## 2.1 Composition de la sève phloémienne

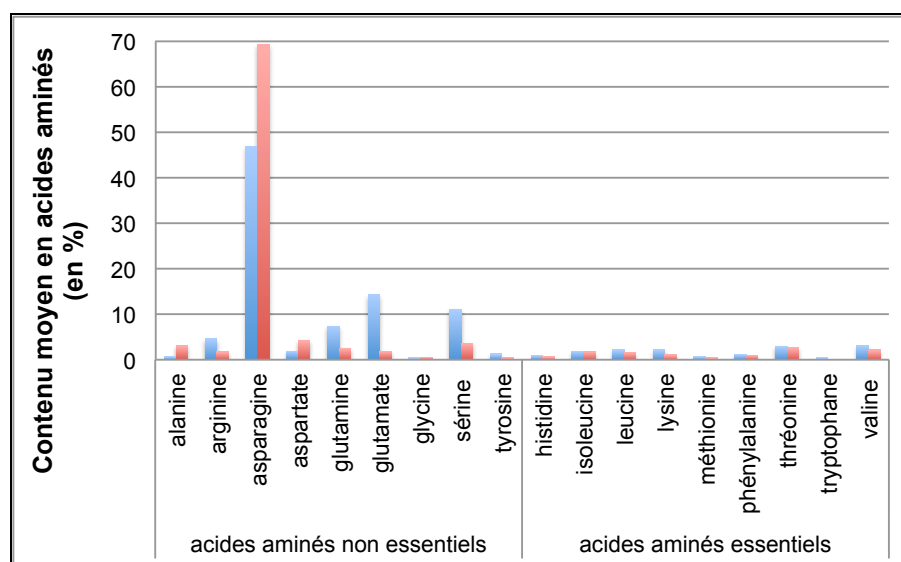
Le phloème est un tissu vivant dont les éléments fonctionnels majeurs sont les cellules des tubes criblés, qui transportent les produits de la photosynthèse. Ainsi les composés majoritaires de la sève phloémienne sont les carbohydrates. Le saccharose est le sucre le plus transporté dans la plupart des plantes, certainement en raison de sa stabilité chimique (c'est un sucre non réducteur), et de sa faible viscosité en solution concentrée (Lucas, *et al.*, 1988). La concentration en sucre est si importante (elle peut atteindre 1 M) que la pression osmotique engendrée est 2 à 5 fois plus forte que celle mesurée dans l'hémolymphe des insectes. Cette concentration élevée constitue sans doute l'une des causes empêchant bon nombre de ces animaux d'utiliser la sève phloémienne comme source nutritionnelle. Pour contrer ce problème, il a été montré que les pucerons sont capables d'osmorégulation, notamment grâce à une forte activité enzymatique de l' $\alpha$ -glucosidase (Ashford, *et al.*, 2000) et à la présence d'uniporteurs (IAGC, 2010). Le puceron utilise alors essentiellement le saccharose comme source de carbone et d'énergie (Febvay, *et al.*, 1999 ; Rhodes, *et al.*, 1996).

Les lipides et les stérols ne sont pas des composés retrouvés en grande quantité dans la sève phloémienne. Toutefois peu d'analyses de ces composés ont été réalisées sur ce compartiment de la plante (Dinant, *et al.*, 2010 ; Douglas, 2003).

La sève phloémienne est assez riche en substances inorganiques (1 à 5 g/l) avec comme composés majoritaires, le potassium ( $K^+ = 50-150$  mM) et le phosphate ( $PO_4^{3-} = 10-50$  mM). Le potassium joue un rôle crucial dans le transport des éléments du phloème (Kochian, 2000) et le phosphate, ainsi que d'autres anions comme le bicarbonate, interviennent dans la détermination du pH de la sève phloémienne (7,3-8 unités) (Fisher, 2000 ; Marschner, *et al.*, 1996 ; Ziegler, 1975). Le magnésium ( $Mg^{2+}$ ) et le chlore (Cl) font également partie des principaux ions inorganiques mobiles du phloème (5 mM et 10 mM respectivement).

Les principaux composés nitrogénés de la sève phloémienne de la plupart des plantes sont les acides aminés libres, avec des concentrations allant de 50 à 800 mM. En revanche, la concentration en ammonium est très faible et celle du nitrate indétectable (Douglas, 2003). Les compositions en acides aminés de la sève phloémienne de *Medicago sativa* et de *Vicia faba*, légumineuses sur lesquelles le puceron *A. pisum* se nourrit, ont été déterminées (Figure 7). Chez ces légumineuses, 2 acides aminés (asparagine et glutamine) représentent à eux deux plus de 75 % des acides aminés de la sève. Chez *Medicago sativa* l'acide aminé dominant est l'asparagine représentant 69,4 % des acides aminés totaux, alors que

l'asparagine représente 46,7 % des acides aminés de la sève phloémienne de *Vicia faba* (Girousse, *et al.*, 1991 ; Sandstrom, *et al.*, 2001). Les dix acides aminés arginine, histidine, isoleucine, leucine, lysine, méthionine, phénylalanine, thréonine, tryptophane, et valine, qualifiés d'essentiels au bon développement chez le rat (Rose, *et al.*, 1948), le sont également pour la plupart des insectes et notamment pour le puceron du pois qui ne peut les synthétiser (Douglas, 2006 ; IAGC, 2010 ; Retnakaran, *et al.*, 1967 ; Sandstrom, *et al.*, 1994 ; Wilson, *et al.*, 2010). Or, bien qu'ils soient détectés dans la sève des légumineuses, leur proportion cumulée ne dépasse pas 20 % des acides aminés totaux (Girousse, *et al.*, 1991 ; Sandstrom, *et al.*, 2001). Au niveau protidique, la sève phloémienne des plantes est composée de quantités généralement négligeables (1 ‰) de protéines qui, de plus, ne peuvent avoir de rôle nutritionnel car il n'y a pas d'endopeptidases digestives chez le puceron. Les acides aminés libres de la sève phloémienne constituent alors la seule source de composés azotés dont dispose l'insecte pour la synthèse de ses protéines. En outre, certains acides aminés interviennent dans des voies métaboliques importantes et sont indispensables au développement des insectes (Dadd, 1973). C'est le cas tout particulièrement des acides aminés aromatiques comme la tyrosine et la phénylalanine qui participent à différents processus lors de la synthèse de l'exosquelette, tissu régénéré à chaque mue au cours du développement des insectes. (Rahbé, *et al.*, 1986).



**Figure 7. Composition moyenne en acides aminés de la sève phloémienne de deux légumineuses.**

En bleu la fève *Vicia faba*, en rouge la luzerne *Medicago sativa* (données issues de Girousse *et al.*, 1991, Sandström et Pettersson, 1994).



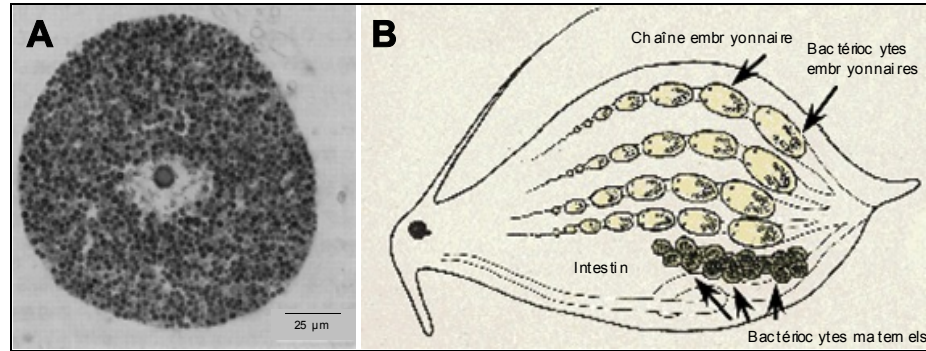
Enfin, la composition de la sève phloémienne est très variable d'une plante à l'autre avec de grandes fluctuations physiologiques tant sur de longues périodes (cycle saisonnier, stade végétatif) que sur de courtes échelles temporelles ou spatiales (cycle nyctéméral, position architecturale dans la plante) (Gholami, *et al.*, 2004 ; Sharkey, *et al.*, 1976 ; Smith, *et al.*, 1980 ; Winter, *et al.*, 1992). L'adaptation du puceron à cette source alimentaire déséquilibrée et variable, n'a été possible que grâce à son association avec une bactérie symbiotique intracellulaire dont le métabolisme apporte une complémentarité nutritionnelle : *Buchnera aphidicola*. (Douglas, 1988 ; 1992 ; Febvay, *et al.*, 1995 ; Febvay, *et al.*, 1999 ; Liadouze, *et al.*, 1995 ; Sasaki, *et al.*, 1995).

---

## 2.2 La bactérie symbiotique *Buchnera aphidicola*

Le symbiote primaire obligatoire des pucerons est la bactérie *Buchnera aphidicola* (Munson, *et al.*, 1991a) appartenant à la subdivision des  $\gamma$ -protéobactérie qui comprend également *Escherichia coli* (Charles, *et al.*, 2001 ; Herbeck, *et al.*, 2005 ; Munson, *et al.*, 1991a ; Munson, *et al.*, 1991b). Des données moléculaires et fossiles indiquent que l'association *Buchnera*-puceron aurait débuté il y a environ 150 millions d'années (Moran, *et al.*, 1993 ; Moran, *et al.*, 1994 ; Von Dohlen, *et al.*, 2000).

Les symbiotes du puceron sont hébergés dans des cellules spécialisées d'origine eucaryote, les bactériocytes. Ces derniers sont regroupés dans une structure appelée bactériome, située à proximité des ovaires, dans la cavité abdominale du puceron (Figure 8) (Baumann, *et al.*, 1995 ; Dixon, 1998). Contrairement à d'autres symbioses intracellulaires, les bactéries ne se retrouvent pas libres dans le cytoplasme bactériocytaire, mais elles sont entourées d'une membrane d'origine eucaryote, appelée membrane symbiosomale.



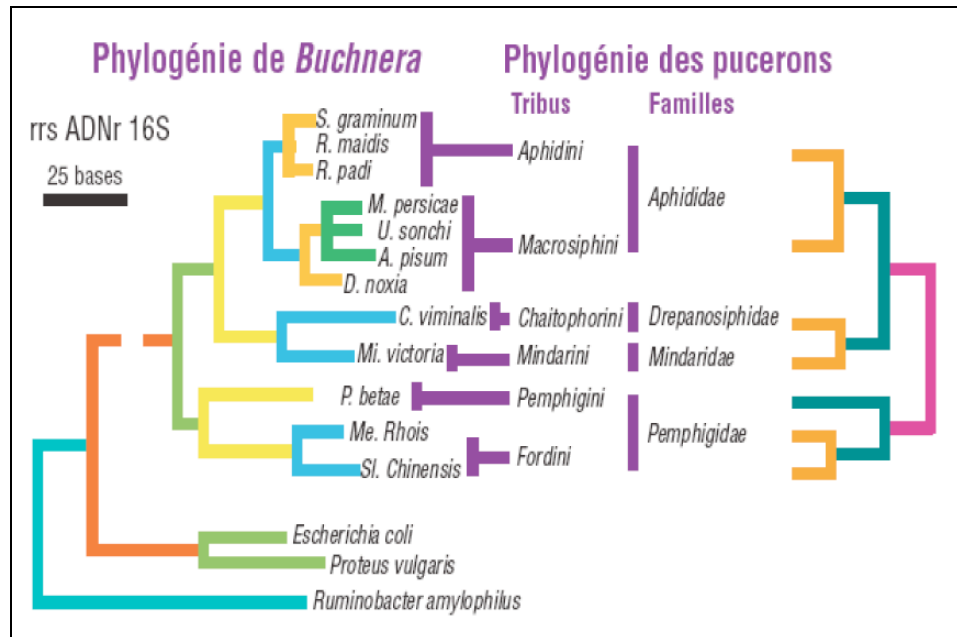
**Figure 8. Localisation des bactéries symbiotiques *Buchnera aphidicola* au sein des bactériocytes et répartition de ces derniers dans la cavité abdominale du puceron.**

**A)** Photo d'un bactériocyte avec, au centre, le noyau de la cellule eucaryote entouré de bactéries (d'après Fukatsu, <http://buchnera.gsc.riken.go.jp>).

**B)** Coupe schématique d'un puceron montrant le chapelet de bactériocytes dans la cavité abdominale formant le bactériome ainsi que les chaînes embryonnaires (d'après Sasaki, <http://buchnera.gsc.riken.go.jp>).

Il est à noter que les bactéries symbiotiques sont transmises verticalement de la mère à la descendance (Buchner, 1965a) (cf mécanisme de transmission détaillé §3.3 p 73) et que par conséquent, lors de la reproduction asexuée, les femelles possèdent en elles deux compartiments symbiotiques (maternel et embryonnaire).

La transmission verticale des bactéries symbiotiques a entraîné la co-spéciation des deux partenaires. Ainsi les événements de spéciation des hôtes correspondent aux événements de divergences des endosymbiotes associés, comme cela est révélé par la parfaite congruence entre les phylogénies des deux partenaires de la symbiose (Figure 9). Durant ce processus de coévolution, les deux partenaires ont perdu leur autonomie : *B. aphidicola* ne peut être cultivée en dehors de son hôte et les pucerons ne peuvent se reproduire sans leur endosymbiote (cf § 4.3 p 83).



**Figure 9. Arbres phylogénétiques de *Buchnera aphidicola* et des pucerons hôtes (d'après Rahbé *et al.*, 2007).**

L'arbre relatif à l'endosymbiote est basé sur une étude de l'ARNr 16S, alors que l'arbre des pucerons a été construit grâce à l'analyse des caractères morphologiques de fossiles de pucerons. Le parallélisme des deux arbres, en dépit de l'utilisation de méthodes distinctes, confirme une co-spéciation des pucerons et des bactéries symbiotiques.

### 2.3 Le génome de *Buchnera aphidicola*

L'adaptation de *B. aphidicola* à la vie intracellulaire a grandement façonné l'évolution de son génome, contrainte de plus, par le faible nombre de bactéries transmises d'une génération à l'autre. En effet, au stade larvaire L1 de l'hôte, les bactéries sont environ au nombre de 120 000, réparties à raison de 3 000 bactéries par bactériocyte, et seul un millier de bactéries (soit 120 fois moins) sont transmises à un embryon (Mira, *et al.*, 2002 ; Wilkinson, *et al.*, 2003). Cette drastique réduction des populations symbiotiques lors de la transmission intergénérationnelle, aussi qualifiée de « goulot d'étranglement », a d'importantes conséquences tant sur la vitesse d'évolution que sur les propriétés du génome de *B. aphidicola*.

A ce jour, cinq génomes de *B. aphidicola*, isolées de différentes espèces de pucerons, ont été séquencés, dont le premier fut celui de la bactérie symbiotique du puceron du pois *A. pisum* (Shigenobu, *et al.*, 2000). Les génomes de *B. aphidicola* séquencés par la suite correspondent au symbiote de différentes espèces de pucerons : puceron des céréales *Schizaphis graminum* (Tamas, *et al.*, 2002), du pistachier *Baizongia pistaciae* (van Ham, *et al.*, 2003), du cèdre *Cinara cedri* (Perez-Brocal, *et*

*al.*, 2006) et celui du thuya *Cinara tujaefilina* (Lamelas, *et al.*, 2011). En 2009, sept autres génomes de *B. aphidicola* provenant de différentes souches du puceron du pois ont été publiés (Moran, *et al.*, 2009). Tous les génomes de *B. aphidicola* partagent des propriétés similaires avec d'autres génomes d'endosymbiotes : i) une absence totale de recombinaison, ii) une augmentation du taux de substitutions nucléotidiques, iii) un fort biais mutationnel en faveur des bases adénine (A) et thymine (T), iv) un biais d'usage des codes, v) la fixation de mutations délétères par dérive génétique aléatoire (Wernegreen, 2002) et v) une taille de génome extrêmement réduite allant de 0,42 à 0,65 Mb (Gil, *et al.*, 2002).

L'analyse de ces génomes bactériens révèle la perte de gènes devenus inutiles aux endosymbiotes dans leur environnement intracellulaire, comme la plupart des gènes de réparation et de recombinaison de l'ADN (Perez-Brocal, *et al.*, 2006 ; Shigenobu, *et al.*, 2000 ; Tamas, *et al.*, 2002 ; van Ham, *et al.*, 2003). C'est le cas par exemple du gène *recA*, élément indispensable à la recombinaison homologue. On notera également l'absence d'autres gènes impliqués dans la réponse SOS, tels que le gène *uvrABC*, codant des protéines impliquées dans la lutte contre les effets des UV sur l'ADN (Moran, *et al.*, 2001) ainsi que les gènes *lexA* et *umuCD*. De plus, les gènes impliqués dans la méthylation et la restriction de l'ADN sont également absents du génome de *B. aphidicola*, montrant la vulnérabilité de cette bactérie aux infections de bactériophages et de son ADN aux coupures par des enzymes de restriction exogènes.

Les génomes de *B. aphidicola* indiquent que ces bactéries possèdent une respiration aérobie. Ceci est en accord avec leur localisation dans les bactériocytes, cellules entourées de nombreuses trachées véhiculant l'oxygène et possédant d'abondantes mitochondries dans leur cytoplasme. *A contrario*, *B. aphidicola* a perdu les gènes de la fermentation et de la respiration anaérobie. La bactérie symbiotique est capable de produire de l'ATP en utilisant le gradient électrochimique de protons généré par le système de transport d'électrons comme cela est révélé par la présence de l'opéron  $F_0F_1$  de type ATP synthétase (Brinza, *et al.*, 2009 ; Shigenobu, *et al.*, 2000 ; Wernegreen, 2002 ).

Le métabolisme central chez *B. aphidicola* repose sur l'utilisation des sucres (glucose et mannitol) via les voies de la glycolyse et du pentose phosphate. Cette dernière génère du NADPH, indispensable aux réactions réductrices de biosynthèse (en particulier, lors de la synthèse des acides gras et des stéroïdes) et produit du ribose 5-phosphate précurseur de la synthèse des nucléotides. La question de la biosynthèse par *B. aphidicola* de ses propres nucléotides reste toutefois non encore résolue, car plusieurs

enzymes nécessaires à l'interconversion des nucléotides entre leurs formes désoxy ou mono-, di- et tri-phosphatés ne semblent pas être codées sur son génome. La gluconéogenèse, voie inverse de la glycolyse, n'est plus fonctionnelle chez *B. aphidicola*, notamment suite à la perte du gène *fbp* codant la fructose 1,6-biphosphatase. Cette enzyme, intervenant dans la gluconéogenèse, joue également un rôle important dans la régulation de l'équilibre entre glycolyse et gluconéogenèse (Zientz, *et al.*, 2004).

L'oxydation du pyruvate, produit ultime de la glycolyse, ne peut être réalisée dans le cycle de Krebs qui est incomplet chez *B. aphidicola*. Les flux de carbone et d'azote sont donc majoritairement orientés vers la synthèse des acides aminés. En effet, une particularité du génome de la bactérie est la conservation de nombreux gènes impliqués dans les voies de biosynthèse des acides aminés. Ils représentent 10 % du génome de *B. aphidicola*, soit une soixantaine de gènes, contre seulement 2 % chez *E. coli* (Shigenobu, *et al.*, 2000). De plus, l'analyse du génome a également montré la conservation des gènes de biosynthèse des acides aminés essentiels pour le puceron et, à l'inverse, l'absence quasi totale des gènes codant la biosynthèse des acides aminés non essentiels (Shigenobu, *et al.*, 2000). Les voies de biosynthèse ainsi maintenues sont celles de l'arginine, l'histidine, l'isoleucine, la leucine, la lysine, la phénylalanine, la thréonine, le tryptophane et la valine. Les précurseurs utilisés pour ces biosynthèses sont soit importés depuis les cellules hôtes, soit synthétisés à partir du catabolisme des sucres : acides aminés non essentiels, oxaloacétate, pyruvate, phosphoénol pyruvate,  $\alpha$ -cétoglutarate, 3-phosphoglycérate, érythro-4-phosphate, ribose-5-phosphate.

Cette spécialisation fonctionnelle de la bactérie symbiotique pour la fourniture en acides aminés est aussi démontrée par la présence de plasmides nutritionnels dans son génome. On notera ainsi l'existence, selon les souches de *B. aphidicola*, de un ou deux plasmides, pLeu et pTrp, portant respectivement les gènes codant pour des enzymes nécessaires à la biosynthèse de la leucine ou du tryptophane. Ces gènes, localisés sur le chromosome chez *E. coli*, ont été probablement transférés dans ces plasmides à partir du chromosome bactérien durant l'adaptation à la vie intracellulaire (Gil, *et al.*, 2006 ; Latorre, *et al.*, 2005). Une caractéristique du plasmide pLeu est la présence de tous les gènes codant les enzymes spécifiques à la voie de synthèse de la leucine alors que seulement deux gènes codant pour deux enzymes intervenant dans la voie de biosynthèse du tryptophane sont présents sur le plasmide pTrp. Il est à noter que de si petits plasmides nutritionnels sont uniques dans le monde bactérien. Leur maintien dans *B. aphidicola* doit certainement être le résultat d'une

pression de sélection en liaison avec le rôle trophique de cette bactérie dans la symbiose avec le puceron (Viñuelas, *et al.*, 2011).

De manière surprenante, l'annotation du génome de *B. aphidicola* a révélé un faible nombre de transporteurs par rapport aux bactéries de forme libre. Alors que les transporteurs ABC, qui représentent un vaste ensemble de protéines transmembranaires dont le rôle est le transport unidirectionnel de part et d'autre de la membrane cytoplasmique, sont retrouvés dans tous les génomes d'espèces bactériennes séquencés (Tomii, *et al.*, 1998), *B. aphidicola* n'a en revanche conservé que quelques gènes codant ces transporteurs (Shigenobu, *et al.*, 2000). Les systèmes de transport PTS (phosphoenolpyruvate:carbohydre phosphotransferase system) semblent être fonctionnels chez la bactérie symbiotique et permettent l'import de glucose et de mannitol. Sauf pour ces transporteurs, aucun autre gène de transporteur spécifique de substrat n'a été identifié et seuls des systèmes de porine ou de transport non-spécifique sont référencés. Ces canaux sont probablement la fonction clé de transport chez *B. aphidicola*, en effet les porines Omp sont très généralistes et sont les seuls transporteurs de la membrane externe chez *B. aphidicola* (Charles, *et al.*, 2011). De manière intéressante, Poliakov et collaborateurs (2011) montrent chez *B. aphidicola* provenant de *A. pisum*, que la protéine OmpF est l'une des plus abondantes protéines et qu'elle est classée sixième sur les 400 protéines identifiées lors de l'analyse du protéome.

Comme pour *Salmonella typhimurium* et *Yersinia enterocolitica*, il est possible que le flagelle de *B. aphidicola* serve de structure de transport plutôt que d'organe locomoteur (Kubori, *et al.*, 1998 ; Young, *et al.*, 1999b). En effet, les gènes *fliC* et *fliD*, codant la partie terminale du flagelle à l'origine normalement de la motilité de la bactérie, ont été perdus chez *B. aphidicola* (Shigenobu, *et al.*, 2000). De plus, 11 des 16 gènes du flagelle de *B. aphidicola* sont fortement exprimés et ont subi une évolution accélérée (Viñuelas, *et al.*, 2007) et de nombreux corps basaux de flagelles sont incorporés dans la membrane cellulaire de la bactérie (Maezawa, *et al.*, 2006). Enfin, il a été montré que des mutants *fliC* et *fliD* d'*E. coli* avaient la capacité d'utiliser leur système flagellaire comme transporteur de peptides (Majander, *et al.*, 2005). Sur la base de toutes ces observations, il a été proposé que les gènes conservés du flagelle sont essentiels dans le cadre de la relation symbiotique *Buchnera*/puceron en ayant acquis une fonction de transport de protéines (Shigenobu, *et al.*, 2000 ; Toft, *et al.*, 2008 ; Viñuelas, *et al.*, 2007)

## 2.4 Le génome du puceron du pois

Le puceron du pois *Acyrtosiphon pisum* a été choisi par la communauté internationale (IAGC, International Aphid Genomics Consortium) afin d'être séquencé comme représentant de l'ordre des Hémiptères (Sabater-Muñoz, *et al.*, 2006). Les séquences du génome ainsi qu'une vue d'ensemble des fonctions principales représentées dans le génome ont été décrites en 2010 lors de la publication de l'annotation du génome par ce consortium (IAGC, 2010).

Le génome du puceron du pois comporte 4 chromosomes holocentriques (trois autosomaux et un chromosome X) pour une taille totale de 464 Mb. Plusieurs méthodes (automatisées ou manuelles, basées sur l'homologie de séquence d'ARNm et/ou de protéines) ont été utilisées pour l'annotation de ce génome (Tableau 1), conduisant à une annotation combinée dénombrant 34 604 gènes. L'analyse du phylome d'*A. pisum* révèle que 2 459 familles de gènes apparaissent avoir subi une duplication linéaire spécifique, un nombre supérieur à ce qui est observé chez les autres génomes d'insectes séquencés et annotés à ce jour.

**Tableau 1. Résumé des résultats d'annotation des gènes du puceron du pois (d'après IAGC, 2010).**

Le nombre de gènes codant des protéines, déterminés par chacune des méthodes d'annotation utilisées, et la caractéristique des transcrits sont reportés. *In fine*, 34 602 gènes prédits ont été introduits dans le set officiel de gènes (OGS, Official Gene Set).

Logiciel d'annotation	Type de prédiction	Nombre de gènes	Nombre d'ARNm	Longueur moyenne d'un ARNm	Nombre d'exons par ARNm	Longueur moyenne d'un exon
NCBI RefSeq	Evidence	11 089	11 308	1,908 bp	7,6	251 bp
NCBI Gnomon	<i>ab initio</i> plus évidence	37 994	37 994	887 bp	3,9	222 bp
Augustus	<i>ab initio</i>	33 713	40 594	982 bp	5,3	223 bp
Fgenesh	<i>ab initio</i> plus évidence	30 846	30 846	1,048 bp	4,5	232 bp
Fgenesh++	<i>ab initio</i> plus évidence	26 773	26 773	1,148 bp	4,9	236 bp
Maker	<i>ab initio</i>	23 145	23 145	854 bp	6	142 bp
Geneid	<i>ab initio</i>	62 259	62 259	553 bp	2,9	194 bp
Genscan	<i>ab initio</i>	32 320	32 320	84 bp	3,5	241 bp
Glean	Consensus	36 606	36 606	943 bp	4,3	220 bp
GLEAN (-refseq)	Consensus	24 355	24 355	657 bp	2,8	233 bp
OGS 1.0	NCBI RefSeq + GLEAN non redondant	34 602	34 821	1,024 bp	4,3	241 bp

Les régions assemblées de ce génome possèdent la plus faible proportion en base G et T (29,6 %) de tous les génomes d'insectes séquencés à ce jour.

Par comparaison à d'autres insectes, l'analyse du génome du puceron du pois révèle un plus faible nombre de gènes impliqués dans le système immunitaire. Cette observation permet de supposer que la réduction des capacités immunitaires pourrait faciliter le maintien du symbiote dans l'organisme. Une autre possibilité serait que la reproduction rapide et l'ingestion de sève phloémienne largement dépourvue de microorganismes, diminueraient les pressions de sélection pour la conservation de coûteuses protections immunitaires présentant un avantage limité (Gerardo, *et al.*, 2010 ; IAGC, 2010).

L'annotation a également révélé de nombreux gènes liés aux perceptions olfactives et gustatives, ce qui semble cohérent avec le mode de nutrition du puceron du pois (cf §1.2 p 41). On dénombre ainsi respectivement, 15 et 13 gènes putatifs codant des protéines liant des substances odorantes (OBPs) ou des protéines chimiosensorielles (CSPs), ainsi que respectivement, 79 et 77 gènes appartenant à la famille des récepteurs olfactifs (ORs) ou des récepteurs gustatifs (GRs). Globalement le nombre de gènes OR et GR n'est pas significativement différent de ceux des autres insectes dont les génomes ont été séquencés (IAGC, 2010 ; Zhou, *et al.*, 2010)

---

#### 2.4.1 Les gènes du transport

La pression osmotique de la sève phloémienne est beaucoup plus forte que celle de l'hémolymphe du puceron (Karley, *et al.*, 2005), il est donc aisé d'imaginer que le transport des sucres abaissera ce gradient de concentration. L'annotation du génome d'*A. pisum* a mis en évidence l'absence de symporteurs sodium-sucres (ces protéines facilitent le mouvement contre un gradient de concentration). Le transport de sucres de l'intestin vers l'hémolymphe reposerait apparemment sur des uniporteurs, protéines qui profitent du gradient de concentration pour transporter les sucres de l'intestin dans les cellules épithéliales puis des cellules épithéliales vers l'hémolymphe.

Le génome du puceron du pois contient un large nombre de gènes codant des uniporteurs, dont approximativement 200 gènes codant des protéines de la superfamille MFS (« major facilitator superfamily »).

Chez le puceron du pois, l'identité moléculaire des transporteurs d'acides aminés reste encore largement inconnue, mais on suppose qu'ils



possèdent sûrement des caractéristiques communes avec les transporteurs d'acides aminés d'autres espèces. Price et collaborateurs (2011) complètent l'identification et l'annotation des transporteurs d'acides aminés chez *A. pisum* qu'avaient débutées Nakabachi et collaborateurs (2005). L'annotation a révélé 40 transporteurs putatifs d'acides aminés appartenant à la superfamille APC (« amino acid/polyamine/organocation ») comprenant 18 transporteurs APC et 22 transporteurs AAAP (« amino acid/auxin permease ») putatifs (Nakabachi, *et al.*, 2005 ; Price, *et al.*, 2011). Chez les eucaryotes, les transporteurs appartenant à la famille APC catalysent les transports de type uniport, symport, et antiport d'une large gamme de substrats au travers des membranes lipidiques (Saier, 2000), alors que les transporteurs appartenant à la famille AAAP catalysent le symport d'auxine ou celui d'un ou plusieurs acides aminés au travers des membranes lipidiques (Saier, 2000 ; Young, *et al.*, 1999a ).

---

#### 2.4.2 Les gènes des protéines cuticulaires

Chez les arthropodes, la chitine contribue à la structure de la cuticule et on distingue 3 classes de protéines se liant à la chitine. Le génome du puceron du pois comprend : i) de nombreux gènes contenant la séquence consensus R&R (domaine conservé définissant la plus grande classe de protéines cuticulaires), ii) de multiples copies des gènes ayant un domaine CBD (« chitin-binding domain ») et iii) des gènes de la troisième classe, contenant un domaine « chitine déacétylase », ne représentant que 5 des 6 types principaux (IAGC, 2010).

92 gènes de la première classe (R&R) ont été identifiés (Gallot, *et al.*, 2010). Parmi ceux-ci, le type RR-2 est le plus représenté avec 78 gènes ce qui est comparable à *Bombyx mori* (Futahashi, *et al.*, 2008) ou à *Anopheles gambiae* (Cornman, *et al.*, 2008). Par contre, seuls 11 gènes du groupe RR-1 et 3 du groupe RR-3 sont identifiés chez *A. pisum*, ce qui est plus faible comparativement aux insectes précédemment cités.

Globalement, en comparaison avec d'autres insectes, le puceron du pois possède moins de gènes codant des chitinases (enzymes chitinolytiques participant à la digestion de l'ancienne cuticule lors des mues). Cette différence reflète peut-être le fait que les insectes hémimétaboles, qui ne subissent pas de métamorphose complète pour atteindre le stade adulte, ne nécessitent pas une importante reconstruction de l'exosquelette.

---

### 2.4.3 Les gènes du développement

Shigenobu et collaborateurs (2010) ont annoté manuellement 387 gènes du développement codés dans le génome du puceron du pois. Ils ont également identifié 57 gènes impliqués dans le développement chez d'autres insectes mais n'ayant aucun orthologue chez *A. pisum* (en considérant l'assemblage actuel du génome).

Ces auteurs ont tout d'abord examiné le répertoire génétique des 7 voies majeures de signalisation qui sont ubiquitaires aux métazoaires : cascade Wnt, TGF $\beta$  (Transforming Growth Factor beta), Hh (Hedgehog), RTK (Receptor Tyrosine Kinase), voie Notch, récepteurs nucléaires et JAK/STAT (Janus Kinase : signal transducer and activator of transcription). 99 gènes ont ainsi été répertoriés et, parmi ces gènes, de nombreux cas de duplications sont mis en évidence avec parfois jusqu'à 5 copies d'un même gène. Les auteurs ont également identifié 94 gènes contenant un motif homéotique ainsi que 78 gènes impliqués dans la mise en place d'éléments majeurs lors du développement (formation des axes corporels, segmentation, gènes *hox*, spécialisation des lignées germinales, neurogenèse, développement des yeux).

---

### 2.4.4 Métabolisme des acides aminés et symbiose

Les gènes du puceron du pois contribuant à la biosynthèse et à la dégradation des acides aminés dans le contexte de la symbiose avec *B. aphidicola* ont été décrits par Wilson et collaborateurs (Wilson, *et al.*).

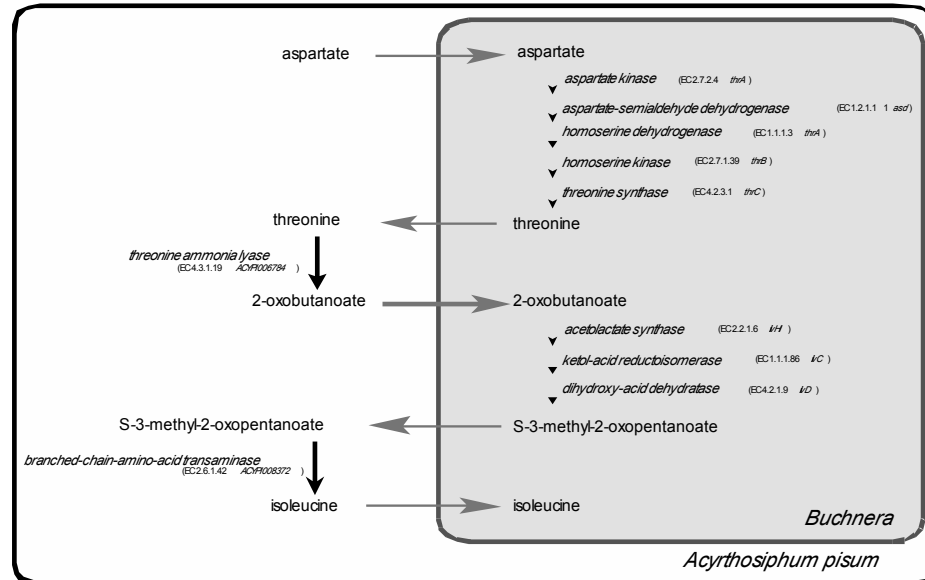
Le génome du puceron du pois compte 66 gènes contribuant à la synthèse d'acides aminés et 93 gènes impliqués dans leur dégradation (Wilson, *et al.*, 2010). Lors de l'annotation du génome de *B. aphidicola*, il avait été montré que celui-ci ne possédait pas de gènes de la dégradation des acides aminés (Prickett, *et al.*, 2006 ; Shigenobu, *et al.*, 2000). Cette première observation introduit le concept de la complémentarité des génomes entre le puceron et sa bactérie symbiotique.

Seize gènes codant 10 transaminases différentes ont été identifiés chez le puceron du pois. Les transaminases, également nommées aminotransférases, jouent un rôle important dans le métabolisme des acides aminés. Elles permettent de transférer le groupement amine (-NH<sub>2</sub>) d'un acide aminé sur un  $\alpha$ -cétoacide et de synthétiser ainsi de nouveaux acides aminés avec l'azote provenant d'acides aminés préexistants. Bien que les duplications des gènes codant des transaminases ne soient pas inhabituelles, seul le puceron du pois semble posséder plus de deux copies de transaminases (3 copies pour l'aspartate transaminase - EC 2.6.1.1 et 2

copies pour l'alanine-glyoxylate transaminase - EC 2.6.1.44). Le gène codant la tyrosine transaminase (EC 2.6.1.5) est en revanche apparemment absent chez le puceron du pois alors qu'elle est présente chez tous les autres génomes d'insectes séquencés. Mais l'aspartate aminotransférase 2 (GOT2, EC 2.6.1.1) a été documentée comme pouvant catalyser la réaction de transamination de la tyrosine chez d'autres eucaryotes (Chang, *et al.*, 2009a ; Lain-Guelbenzu, *et al.*, 1990 ; Yagi, *et al.*, 1990 ) suggérant qu'elle puisse en faire autant chez le puceron.

L'annotation manuelle des gènes du métabolisme des acides aminés a révélé que, comme pour les autres animaux, le puceron du pois n'a pas la capacité de synthétiser *de novo* les 9 acides aminés protéiques dits essentiels (histidine, isoleucine, leucine, lysine, méthionine, phénylalanine, thréonine, tryptophane et valine). En outre, comparativement aux autres insectes séquencés, *A. pisum* ne peut pas synthétiser l'arginine car son génome ne compte aucun gène impliqué dans le cycle de l'urée.

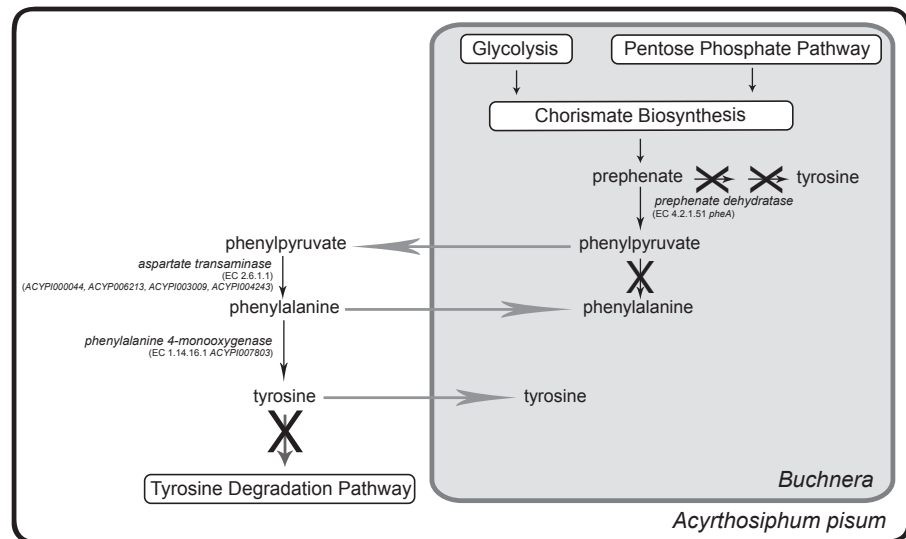
Le puceron du pois a la capacité de dégrader les acides aminés branchés (isoleucine, leucine et valine) et possèdent également deux gènes impliqués dans leur biosynthèse. Ces deux gènes codent la thréonine déshydratase (EC 4.3.1.19) ainsi que l'aminotransférase spécifique (EC 2.6.1.42) catalysant la réaction finale de la synthèse de ces 3 acides aminés branchés (Figure 10). Or *B. aphidicola* ne possède pas les gènes codant ces enzymes (Shigenobu, *et al.*, 2000). Il apparaît ainsi que les gènes de ces voies de biosynthèse sont partagés entre les deux partenaires symbiotiques.



**Figure 10. Voie de biosynthèse de l'acide aminé branché isoleucine partagée entre le puceron du pois et sa bactérie symbiotique *B. aphidicola* (d'après Wilson *et al.*, 2010).**

Dans cette figure, ainsi que dans les figures suivantes, les flèches noires indiquent des réactions supportées par des données d'annotation de génome et les flèches grises représentent le transport de métabolites entre les deux partenaires symbiotiques. L'encadré blanc représente le puceron du pois avec, à l'intérieur, l'encadré gris représentant *B. aphidicola*.

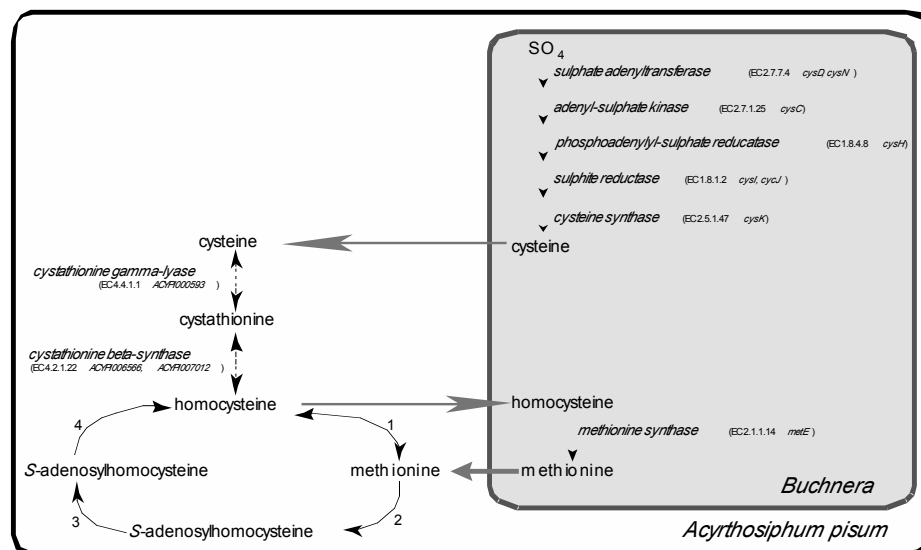
Bien que le puceron du pois soit apparemment le seul insecte séquencé à ne pas posséder de tyrosine transaminase (cf ci-dessus), il possède en revanche 4 gènes codant une aspartate transaminase (EC 2.6.1.1) permettant aussi la transformation du phénylpyruvate en phénylalanine. La phénylalanine ne peut toutefois pas être synthétisée par le puceron sans la fourniture de phénylpyruvate par *B. aphidicola* (Figure 11) (Wilson, *et al.*, 2010). Le génome d'*A. pisum* comprend également le gène codant la phénylalanine 4-monooxygénase (EC 1.14.16.1) catalysant la synthèse de la tyrosine par hydroxylation de la phénylalanine. A *contrario*, il ne possède pas les gènes de la voie de dégradation de la tyrosine (Figure 11).



**Figure 11. Voies de biosynthèse de la phénylalanine et de la tyrosine dans la symbiose de puceron du pois - *B. aphidicola* (d'après Wilson *et al.*, 2010).**

Pour la synthèse de la tyrosine, les gènes manquants chez *B. aphidicola* sont *tyrA* (EC 5.4.99.5) et *tyrB* (EC 2.6.1.57) ; *tyrB* code aussi la réaction finale « perdue » permettant la synthèse de phénylalanine. Se reporter à la légende de la figure 10 pour la signification des flèches et des encadrés.

La parfaite complémentarité des génomes d'*A. pisum* et de son symbiote est également observée pour la voie de biosynthèse des acides aminés sulfurés. En effet, *B. aphidicola* est la seule capable de synthétiser la cystéine à partir de la sérine et du soufre inorganique. Après être fournie au puceron, celui-ci a la capacité de synthétiser l'homocystéine (synthèse non possible par *B. aphidicola*) puis la méthionine. La méthionine ou l'homocystéine est alors fournie en retour à la bactérie symbiotique pour couvrir ses besoins en cet acide aminé sulfuré (Figure 12) (Wilson, *et al.*, 2010).



**Figure 12. Voies de biosynthèse des acides aminés sulfurés dans la symbiose puceron du pois - *B. aphidicola* (d'après Wilson *et al.*, 2010).**

(1) Homocystéine méthyltransférase (EC2.1.1.10) catalysant la formation de méthionine à partir d'homocystéine. (2) S-adénylméthionine synthétase (EC2.5.1.6) produit du S-adénylméthionine à partir de méthionine. (3) la S-adénylméthionine est utilisée par l'ADN méthyltransférase et dans d'autres réactions de méthylation (EC2.1.1.37), résultant en la production de S-adénylhomocystéine. (4) la S-adénylhomocystéine est convertie en homocystéine par la S-adénylhomocystéine hydrolase (EC3.3.1.1). Se reporter à la légende de la Figure 10 pour la signification des flèches et des encadrés.

Cette complémentarité des répertoires de gènes montre comment cette symbiose opère avec succès. *B. aphidicola* fournit à l'hôte ce qu'il ne peut synthétiser et inversement, le puceron fournit à son symbiote les métabolites qui lui manquent. De plus, certains acides aminés essentiels ont comme précurseurs des acides aminés non essentiels (acide glutamique, acide aspartique, sérine), ainsi les voies de biosynthèse des 2 partenaires sont non seulement complémentaires mais également mutuellement dépendantes.

## 2.5 Les études nutritionnelles

Bien avant la publication des données génomiques, la complémentarité et l'interdépendance des voies de biosynthèse des acides aminés essentiels, entre le symbiote et son insecte hôte, avaient été montrées par les nombreuses études métaboliques réalisées sur ce modèle.

Ces études expérimentales, utilisant une combinaison de régimes artificiels à la composition contrôlée avec ou non un traitement antibiotique (respectivement pucerons aposymbiotiques ou symbiotiques), sont

principalement centrées sur les exigences spécifiques en acides aminés essentiels absents de la sève phloémienne. Ainsi, Douglas (1988) montre la synthèse de la méthionine par *B. aphidicola* chez le puceron *Myzus persicae* et Douglas et Prosser (1992) celle du tryptophane par le symbiote de *A. pisum*. La participation de *B. aphidicola* dans le transfert d'azote, de la glutamine ou du glutamate, à d'autres acides aminés a été démontrée par Sasaki et Ishikawa (1995). Febvay et collaborateurs fournissent la preuve directe de la biosynthèse de thréonine, isoleucine, leucine, valine et phénylalanine par la bactérie symbiotique (Febvay, *et al.*, 1995 ; Liadouze, *et al.*, 1996), en mettant également en évidence sa capacité d'adapter sa production d'acides aminés aux besoins nutritionnels du puceron (Febvay, *et al.*, 1999).

Avec les données génomiques actuelles, la participation de *B. aphidicola* à la synthèse des acides aminés essentiels est largement confirmée. Toutefois, seules les études nutritionnelles antérieures permettent d'apprécier l'importance métabolique de chacun de ces acides aminés.

Une des premières études réalisée par Mittler (1971) montre une croissance ralentie des larves produites par des adultes aposymbiotiques de *M. persicae*, lorsque ceux-ci sont élevés sur des milieux carencés en acides aminés essentiels. Cette étude met ainsi en évidence l'importance des acides aminés essentiels pour la croissance des pucerons et leur fourniture par *B. aphidicola*. D'autres études confirment par la suite les faibles performances des pucerons aposymbiotiques comparativement aux individus témoins symbiotiques : un taux de croissance significativement plus faible, une taille adulte réduite et, une reproduction fortement limitée, voire nulle (Douglas, 1992 ; Prosser, *et al.*, 1992b ; Sasaki, *et al.*, 1991).

Enfin, la comparaison des profils en acides aminés des pucerons symbiotiques et aposymbiotiques, ainsi que l'utilisation de milieux artificiels carencés en certains acides aminés, mettent en évidence l'importance métabolique différentielle des acides aminés.

Ainsi, le traitement antibiotique des pucerons élevés sur milieux carencés en tryptophane résulte en la mort de la quasi-totalité des individus, alors que 67 % des pucerons aposymbiotiques à l'âge adulte survivent sur milieu complet (Douglas, *et al.*, 1992). Les besoins trophiques en tryptophane sont confirmés par la proportion réduite mesurée pour cet acide aminé aromatique chez les pucerons aposymbiotiques (Douglas, 1996). La proportion en phénylalanine est également particulièrement diminuée chez les pucerons aposymbiotiques, que ce soit sur milieu artificiel ou sur plante (Douglas, 1996 ; Wilkinson, *et al.*, 1996). Plus récemment, Wilkinson et Ishikawa (2000) montrent qu'une injection de phénylalanine, dans

l'hémolymphe des pucerons aposymbiotiques, réduit l'augmentation et l'accumulation des acides aminés totaux classiquement observées (Wilkinson, *et al.*, 2000). Ce traitement, qui mime le rétablissement d'un système symbiotique chez le puceron sans son symbiote, souligne l'importance de la phénylalanine et le rôle de *B. aphidicola* dans l'approvisionnement en acides aminés essentiels.

Les acides aminés essentiels ne sont pas les seuls pouvant être primordiaux pour le bon développement du puceron. Ainsi, la croissance et la reproduction des pucerons symbiotiques sur milieu sans glutamine sont retardées (Sasaki, *et al.*, 1993). De plus, le suivi de la glutamine marquée au <sup>15</sup>N montre que l'incorporation dans les protéines de l'azote en provenance de cet acide aminé est 10 fois supérieure chez les pucerons symbiotiques que chez les pucerons aposymbiotiques (Sasaki, *et al.*, 1991) et suggère que la glutamine est une importante source d'azote utilisée par la bactérie symbiotique. De plus faibles performances observées chez les pucerons élevés sur milieu carencés en asparagine montrent aussi l'importance de cette dernière (Sasaki, *et al.*, 1993). L'étude des profils en acides aminés des pucerons aposymbiotiques a mis en évidence une plus forte concentration, par rapport aux pucerons symbiotiques, de quatre acides aminés (l'asparagine, l'acide aspartique, la glutamine et la proline) (Liadouze, *et al.*, 1995). Les auteurs suggèrent que ces acides aminés non essentiels sont certainement la principale source d'azote utilisée par le symbiote pour la synthèse d'autres acides aminés (en particulier les acides aminés essentiels), comme ceci avait déjà été suggéré par Sasaki & Ishikawa (1993) pour l'asparagine et la glutamine.

Afin de parvenir à exprimer ses potentialités biotiques (haut niveau de production de biomasse via la reproduction), le métabolisme du puceron doit permettre de pallier les imperfections qualitatives et/ou quantitatives de l'alimentation. Il est maintenant bien documenté, que ceci est réalisé par l'intégration de bactéries symbiotiques manifestement en liaison avec le métabolisme azoté. Cette association (à l'origine d'une nouvelle entité biologique définie comme le symbiocosme) permet à l'insecte l'utilisation efficace d'une source alimentaire déséquilibrée en nutriments azotés. Et, en lui conférant un avantage métabolique certain, lui a rendu possible la colonisation d'une niche écologique autrement inhospitalière.





## 3 Le cycle de vie, la reproduction et le développement du puceron

### 3.1 Cycle de développement larvaire

### 3.2 Reproduction et développement embryonnaire

### 3.3 Transmission de *Buchnera aphidicola*

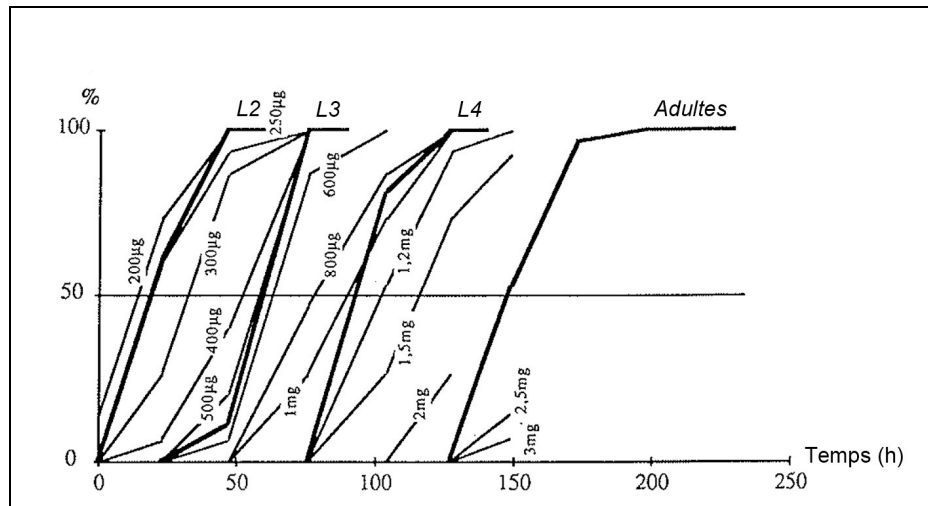
Quelque soit le type de reproduction (sexuée ou parthénogénétique), les pucerons sont des insectes à métamorphose incomplète (insectes hétérométaboles). La jeune larve, issue soit de l'œuf pondu par la femelle sexuée (reproduction sexuée ovipare), soit directement pondue par la femelle parthénogénétique (reproduction parthénogénétique larvipare), est semblable à l'adulte : elle subit différentes mues au cours de sa croissance larvaire et le passage au stade adulte (imago) ne se fait pas par un stade immobile ni une métamorphose totale.

---

### 3.1 Cycle de développement larvaire

En règle générale, les différentes espèces de pucerons ont un développement larvaire en quatre stades à l'exception de quelques espèces qui comptent cinq stades larvaires (Takahashi, 1924a ; b). Les clefs d'identification de ces stades larvaires sont disponibles pour de nombreuses espèces (Eastop, *et al.*, 1972) et ont été décrites pour le puceron du pois *A. pisum* en 1974 par Müller et collaborateurs (1974). Pour de nombreuses espèces d'Aphididae, la durée de chaque stade, le temps total de développement ainsi que la température optimale du développement larvaire, ont également été déterminés. Dans le cas du puceron du pois, Febvay et collaborateurs (1988) ont estimé la durée moyenne des stades larvaires à 30 h pour le premier stade (larve L1), 40 h pour le 2<sup>ème</sup> stade (L2), 33 h pour le 3<sup>ème</sup> stade (L3) et 55 h pour le dernier stade (L4), soit un développement larvaire complet d'environ 160 h pour atteindre le stade adulte. Ces temps de développement concernent les larves produites par des femelles virginipares élevées sur fèves à une température de 21°C, une humidité relative de 70 % et une photopériode de 16 h de jour. Lors de cette étude, la masse moyenne des différents stades a également été déterminée (Figure 13). Une fois l'âge adulte atteint, après une maturation sexuelle comprise entre 1 à 2 jours, les femelles parthénogénétiques commencent à pondre. Leur fécondité est alors en moyenne de 6 larves par jour sur une période d'environ 14 jours (Gabrielle Duport – UMR BF2I,

communication personnelle). Les formes ailées, chez lesquelles on observe une phase de vol avant la ponte, présentent une période de pré-ponte comparativement aux autres morphes (Shaw, 1970).



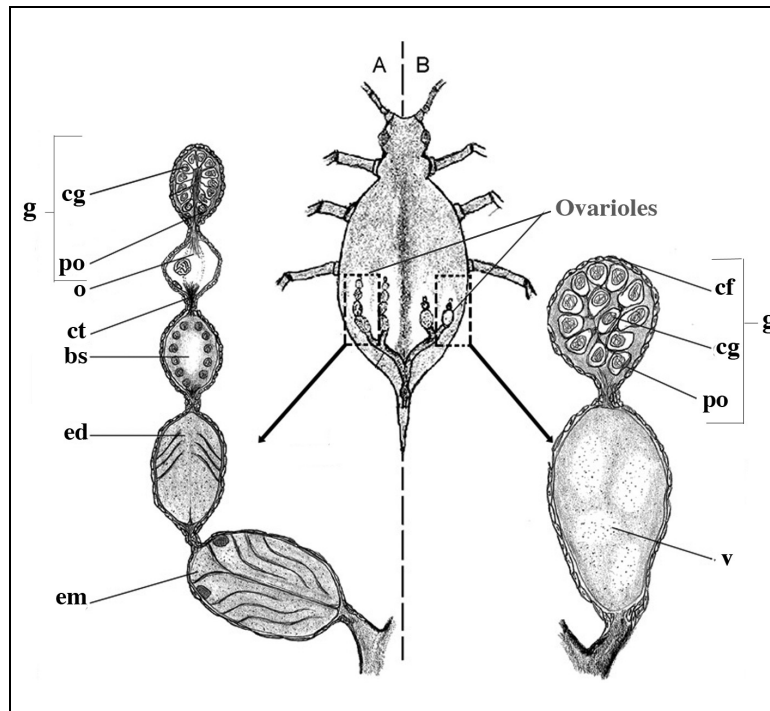
**Figure 13. Développement larvaire du puceron *Acyrthosiphon pisum* sur plant de fève (d'après Febvay *et al.*, 1988).**

Pour chaque stade de développement ou classe de poids, les résultats sont exprimés en pourcentage par rapport à la population totale au temps considéré (h). Les lignes épaisses représentent l'apparition des nouveaux stades (mentionnés au dessus). Les lignes fines représentent l'apparition des nouvelles classes de poids.

Le développement des formes ailées dure généralement au moins 24 h de plus à 20°C et cette différence est due à l'allongement du temps nécessaire à compléter le quatrième stade larvaire.

### 3.2 Reproduction et développement embryonnaire

Les pucerons femelles possèdent deux ovaires fonctionnels localisés dans l'abdomen. Ces ovaires débouchent sur un oviducte commun et court (Büning, 1985). Le nombre d'ovarioles de chaque ovaire varie de manière inter- et intra-spécifique et peut être fonction de la taille du corps, de la qualité de la nutrition, ou encore de la température (Dixon, *et al.*, 1987). Les pucerons possèdent des ovaires méroïstique télotrophique (cf §4.1 p 79) dans lesquels les cellules nourricières sont regroupées dans un germarium situé à l'extrémité antérieure de chaque ovariole (Figure 14).



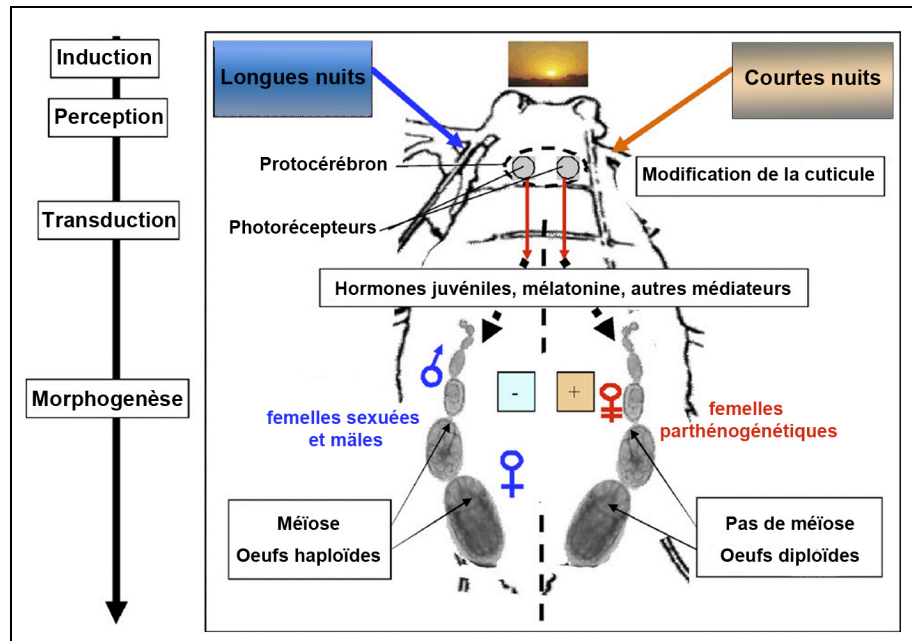
**Figure 14. Représentation des deux types d'ovarioles de puceron en fonction du mode de reproduction (d'après Le Trionnaire *et al.*, 2008).**

**A)** Ovariole d'une femelle parthénogénétique comportant en son extrémité le germarium (g) et à sa base un embryon mature (em).

**B)** Ovariole d'une femelle sexuée avec, à son extrémité, un germarium et, à sa base, un œuf haploïde rempli de vitellus (v). Sont également reportés dans cette représentation : les cellules folliculaires (cf), les cellules germinales (cg), le cordon trophique (ct), un oocyte (o), un pré-oocyte, un embryon au stade blastoderme syncytial (bs) et un embryon en développement (ed).

Ces cellules se différencient à partir d'une cellule germinale primordiale qui est à l'origine également des ovocytes et des cellules folliculaires. Ainsi, chez *A. pisum*, à partir d'une seule de ces cellules primordiales et après 5 divisions, chaque ovariole possèdera approximativement 21 cellules nourricières et 11 futurs oocytes (Miura, *et al.*, 2003). Le devenir des pré-oocytes durant la formation du germarium semble être contrôlé par des facteurs environnementaux, tels que la durée des nuits (Le Trionnaire, *et al.*, 2008). Il est admis que des photorécepteurs présents dans le cerveau du puceron détectent l'alternance du jour et de la nuit (Figure 15). Néanmoins, les modalités de transmission de cette information au germarium ne sont pas encore complètement élucidées : la transduction du signal implique un groupe de cellules neurosecrétrices (non encore identifiées) et la production de différents signaux hormonaux (hormones juvéniles, mélatonine, autres médiateurs...). Selon le type de signal reçu, les pré-oocytes se différencient soit en gamètes haploïdes qui requièrent une fécondation (reproduction sexuée), soit en oocytes diploïdes capables d'initier l'embryogenèse en

absence de gamètes mâles et de méiose (parthénogenèse). C'est au cours du développement précoce des embryons que les deux types de développement (sexué ovipare et asexué vivipare) divergent le plus.

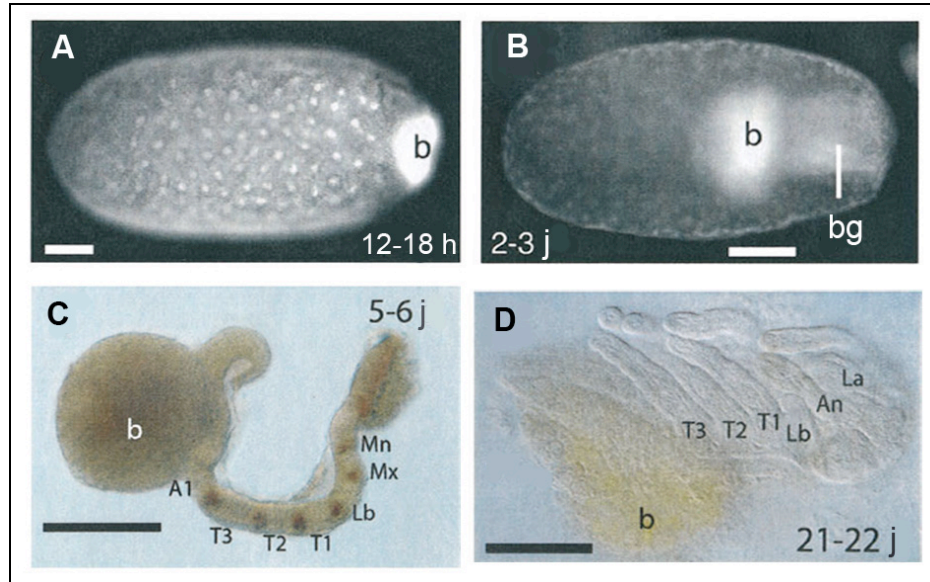


**Figure 15. Représentation schématique des étapes de perception et de transduction de la photopériode induisant le changement de mode de reproduction chez les pucerons (d'après Simon *et al.*, 2010).**

La durée de la nuit est déterminante pour la commutation entre la production de femelles sexuées ovipares et la production de femelles parthénogénétiques vivipares. Le signal photopériodique est perçu dans la tête et la transduction passe par un groupe de cellules neurosécrétrices.

Chez le puceron *A. pisum*, les œufs pondus par les femelles sexuées mesurent environ 1 mm de long et sont remplis de vitellus excepté pour une zone en position postérieure de l'œuf où se situe un amas de bactéries endosymbiotiques (Figure 16A) (Miura, *et al.*, 2003). Durant les 3 premiers jours après la ponte, seuls les œufs fécondés noircissent et acquièrent une épaisse cuticule élaborée par la membrane séreuse. Au cours des premières 24 h s'effectue tout d'abord une division synchronisée des noyaux, ceux-ci migrent ensuite en périphérie de l'œuf, qui atteint le stade blastoderme. Entre 2 à 3 jours après la ponte, la bande germinale entre dans le vitellus (anatrepsis) et forme un tube au centre de l'œuf (gastrulation), la masse bactérienne est alors poussée à l'extrémité de ce tube (Figure 16B). Au cours des 5<sup>ème</sup> et 6<sup>ème</sup> jours, les régions céphalique et thoracique se distinguent et la région abdominale commence à grandir (Figure 16C). On remarque ensuite l'apparition et l'allongement des pattes ainsi que l'ensemble des 15 segments de l'embryon (J7 à J22) (Figure 16D). Puis,

pendant la catatrepsis, l'embryon subit un repositionnement drastique : la tête de l'embryon glisse en position ventrale pour se placer au pôle antérieur de l'œuf.



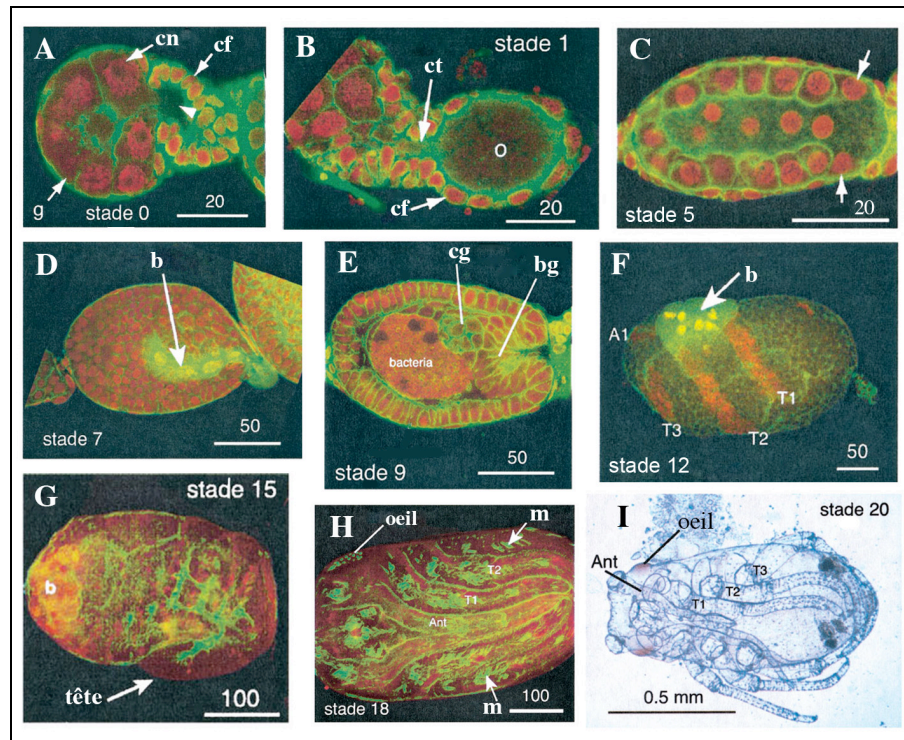
**Figure 16. Principales étapes du développement embryonnaire sexué ovipare chez le puceron du pois (d'après Miura *et al.* 2003).**

**A)** Œuf collecté entre 12 et 18 heures après la ponte : les bactéries symbiotiques (b) sont localisées en position postérieure de l'œuf. **B)** Œuf âgé de 2 à 3 jours après la ponte : la bande germinale (bg) a commencé à plonger dans le vitellus (anatrepsis) et la masse bactérienne (b) est alors poussée en position centrale de l'œuf. **C)** Embryon âgé de 5 à 6 jours : les segments thoraciques et céphaliques se différencient. **D)** Embryon de 21 à 22 jours : l'embryon ainsi que ses appendices augmentent de taille, étapes précédant la catatrepsis. Dans les microphotographies C et D, on distingue : les segments abdominaux (A1), thoraciques (T1, T2, T3) et céphaliques (mandibulaire (Mn), maxillaire (Mx), labial (Lb)). Les barres d'échelles représentent toutes 100  $\mu\text{m}$ .

Les femelles parthénogénétiques chez le puceron du pois possèdent de 6 à 7 ovarioles par ovaire. Les embryons se développent dans les ovarioles et plusieurs stades de développement peuvent être observés au sein d'une même ovariole (Figure 14). Vingt stades embryonnaires différents ont pu être répertoriés dans cette espèce sur la base de modifications morphologiques communes à d'autres embryons d'insectes et à la localisation de marqueurs moléculaires du développement (Miura, *et al.*, 2003). Le développement débute immédiatement après l'ovulation, le premier stade (stade 0) correspondant à la formation de l'oocyte (Figure 17A). Les cellules folliculaires forment, à la base du germarium, un épithélium entourant une zone exempte de cellules. Cette zone est ensuite comblée par un noyau et son cytoplasme associé, provenant du germarium. L'oocyte se sépare ensuite physiquement du germarium (stade 1) mais reste

toutefois lié à ce dernier par un pont cytoplasmique jusqu'à la formation du blastoderme au stade 5 (Figure 17B) (Blackman, 1978). A ce stade, l'oocyte est composé de 32 cellules périphériques. Les noyaux en position postérieure perdent leur synchronisation mitotique (Figure 17C). Au stade 7, les bactéries endosymbiotiques provenant de bactériocytes maternels sont transférées aux embryons (voir les détails de ce transfert dans le paragraphe suivant) (Figure 17D). Aux stades 8 et 9, la bande germinale s'invagine dans la région postérieure (gastrulation), la masse bactérienne est poussée au pôle antérieur (Figure 17E). Au cours des stades 10 à 13, la segmentation du corps se met en place, avec la différenciation, en position ventrale, du lobe céphalique, au centre celle du thorax et, dorsalement, celle de l'abdomen. Puis, les segments thoraciques se différencient ainsi que l'ébauche des pattes (Figure 17F). Au terme de la segmentation (stade 14), la tête de l'embryon bascule au pôle antérieur, les bactériocytes restent en position dorsale (catatrepsis, stade 15, Figure 17G) (Sander, 1976). Au cours des stades 16 à 18, les pattes et les antennes continuent de s'allonger, le cerveau et les ganglions thoraciques sont compactés et les yeux à facettes se différencient (Figure 17H). Aux stades 19 et 20, les embryons croissent rapidement, les cellules musculaires fusionnent et la cuticule est parfaitement formée. L'embryon est prêt à être pondu, il mesure environ 1 mm de long (Figure 17I).





**Figure 17. Principales étapes du développement embryonnaire parthénogénétique vivipare chez le puceron du pois (d'après Miura *et al.* 2003).**

**A)** Stade 0 : formation de l'oocyte. Les cellules folliculaires (cf) forment un épithélium entourant le germarium (g) et le pré-oocyte (marqué d'une pointe de flèche). L'extrémité antérieure de l'ovariole renferme aussi les cellules nourricières (cn) **B)** Stade 1 : séparation de l'oocyte (o) du germarium. Il reste en revanche connecté aux cellules nourricières par le biais du cordon trophique (ct). **C)** Stade 5 : cellularisation et formation du blastoderme. Des noyaux syncytiaux peuvent être observés en position postérieure de l'embryon (flèches) et au centre de ce dernier. **D)** Stade 7 : transmission des bactéries symbiotiques maternelles (b) à l'embryon. **E)** Stade 9 : gastrulation. La bande germinale (bg) s'invagine. En position centrale, on distingue les bactéries symbiotiques et les cellules germinales (cg). **F)** Stade 12 : différenciation des segments céphaliques et thoraciques (T1, T1, T3) **G)** Stade 15 : catatrepsis. **H)** Stade 18 : développement des yeux et des muscles (m). **I)** Stade 20 : embryon mature (les antennes sont annotées (ant)). Les barres d'échelles des photographies A à H ont pour unité le  $\mu\text{m}$ .

### 3.3 Transmission de *Buchnera aphidicola*

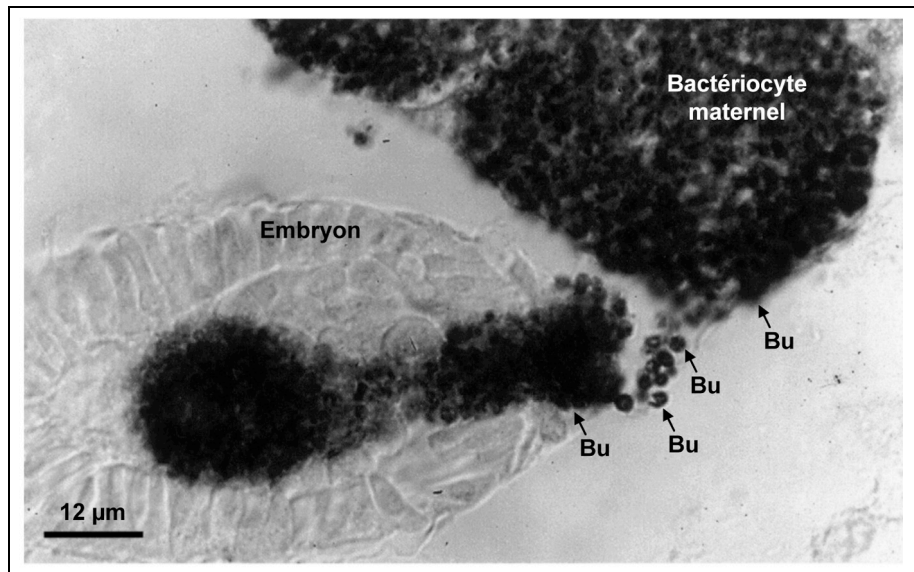
Bien que la localisation de *Buchnera* dans le compartiment embryonnaire soit connue depuis la description de cette symbiose par Paul Buchner (1965a), les mécanismes par lesquels les bactéries symbiotiques sont transmises d'une génération à l'autre n'ont été étudiés que très récemment. Les études de Miura et collaborateurs (2003) et Wilkinson et collaborateurs (2003) ont permis de démontrer que les symbiotes sont transmis par la mère



(de manière verticale) aux œufs sexués ou aux embryons parthénogénétiques via des mécanismes légèrement différents.

Pour les œufs sexués du puceron du pois, les bactéries endosymbiotiques d'origine maternelle sont transmises à l'oocyte avant fécondation, quand celui-ci atteint une taille approximative de 500  $\mu\text{m}$  (Miura, *et al.*, 2003). Juste avant que les bactéries ne soient transmises, les cellules folliculaires s'allongent et forment un « goulot » au pôle apical postérieur de l'oocyte. En pénétrant au travers de multiples ouvertures dans cet épithélium folliculaire, les bactéries colonisent ensuite la zone apicale de l'oocyte. Elles y demeurent jusqu'à la ponte, moment où les noyaux des futurs bactériocytes s'installent dans cette masse bactérienne pour former les cellules bactériocytaires.

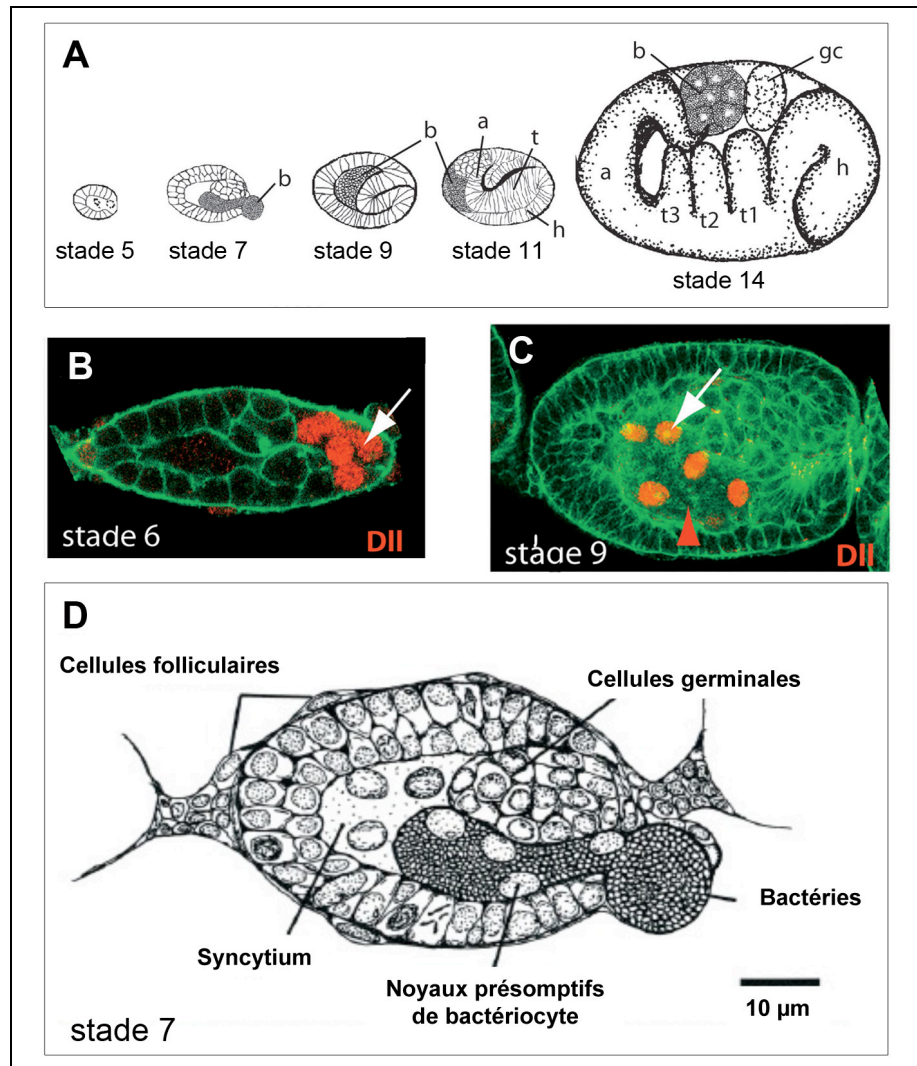
Contrairement à ce qui est observé pour la reproduction sexuée, l'infection des embryons parthénogénétiques par les bactéries endosymbiotiques maternelles s'effectue plus tardivement. En effet, les bactéries sont transférées dans les embryons après l'étape de cellularisation, et plus précisément au stade 7 (Miura, *et al.*, 2003). De plus, il a été établi que toutes les bactéries d'un embryon proviendraient d'un seul bactériocyte maternel (Wilkinson, *et al.*, 2003) (Figure 18). Elles seraient véhiculées via un conduit membranaire reliant la cellule donneuse à l'embryon receveur. Ce conduit résulterait de la fusion, en position postérieure de l'embryon, entre la membrane entourant un groupe de bactéries symbiotiques maternelles et l'épithélium folliculaire (Miura, *et al.*, 2003). Wilkinson et collaborateurs (2003) estiment qu'en moyenne 1088 bactéries sont transmises par embryon et seraient environ 36 700 chez un embryon de 0,8 mm de long (Miura, *et al.*, 2003). Les mécanismes moléculaires responsables du contrôle de la division des bactéries symbiotiques après l'étape de transmission à l'embryon ne sont pas encore connus.



**Figure 18. Transmission de *Buchnera aphidicola* à un embryon de puceron (d'après Wilkinson *et al.* 2003).**

Microphotographie montrant la transmission de *B. aphidicola* (Bu) d'un bactériocyte maternel à un embryon au stade blastoderme cellulaire, chez une femelle parthénogénétique.

Les bactériocytes se différencient très tôt dans l'embryon parthénogénétique sous le contrôle de l'hôte, comme il a été mis en évidence par Braendle et collaborateurs (2003) qui ont suivi, par des expériences d'immunomarquage, la localisation de cinq protéines du développement ubiquitaires chez les insectes. Une de ces protéines, « Distal-less » (Dll), connue pour induire le développement des appendices ventraux chez la drosophile, est exprimée plus particulièrement dans les bactériocytes (Figure 19 B & C). Chez les pucerons, Dll est exprimée dans des noyaux localisés en position postérieure de l'embryon au stade blastoderme syncitial à partir du stade 6 (Figure 19B). Ces noyaux se divisent ensuite rapidement, pour atteindre approximativement 32 noyaux au stade 13 du développement embryonnaire. Au stade 14, ces noyaux sont entourés de membranes cellulaires et, par des étapes successives de divisions, deviennent polyploïdes. Au stade 13, une seconde population de 40 à 60 cellules, localisée en position postérieure à l'extrémité de la bande germinale dorsale, commence également à exprimer la protéine Dll. Les noyaux de ces cellules sont visiblement plus petits que ceux des bactériocytes de la première population. Basé sur de multiples observations d'individus fixés, les auteurs déduisent que ces cellules vont ensuite migrer et viennent s'intercaler entre les premiers bactériocytes. Les bactéries symbiotiques sont alors réparties entre ces 2 populations de cellules et les bactériocytes finaux sont formés (Braendle, *et al.*, 2003).



**Figure 19. Localisation des bactéries symbiotiques et de leurs cellules hôtes à différents stades du développement embryonnaire du puceron (d'après Braendle *et al.*, 2003 et Miura *et al.*, 2003).**

**A)** Schéma d'observation de 5 stades de développement d'embryons parthénogénétiques de puceron du pois. Les bactéries symbiotiques sont transmises au stade 7, les bactériocytes, et en particulier leur membrane, sont formés au stade 14 et renferment alors les bactéries. Les bactéries symbiotiques (b) sont légendées ainsi que la tête (h), les régions thoracique (t) et abdominale (a). Au stade 14, 3 segments thoraciques (T1, T2, T3) et les cellules germinales (gc) sont indiqués.

**B)** Microphotographie, obtenue par microscopie confocale, d'un embryon au stade 6 marqué avec des anticorps dirigés contre la protéine DII (en rouge et marqué d'une flèche). Ces anticorps marquent les noyaux présomptifs de bactériocytes dans la région postérieure de l'embryon.

**C)** Microphotographie, obtenue par microscopie confocale, d'un embryon au stade 9 marqué avec des anticorps dirigés contre la protéine DII.

**D)** Schéma d'une coupe transversale d'un embryon de puceron en cours d'infection par *Buchnera aphidicola*.

Bien qu'on ait pensé pendant longtemps que *Buchnera* intervenait dans la différenciation précoce du bactériocyte, sa future structure d'accueil dans le puceron, cette hypothèse a été remise en discussion par des études moléculaires récentes. Braendle et collaborateurs (2003) montrent, dans un premier temps, que dans des embryons aposymbiotiques (issus de femelle parthénogénétique traitées par antibiotique), les bactériocytes se mettent en place (expression de Dll), mais ne contiennent pas de bactéries symbiotiques. Dans un deuxième temps, les mêmes auteurs confirment que la mise en place précoce des bactériocytes est indépendante de la présence de *B. aphidicola*. Ceci a été montré chez *Tuberaphis styraci*, une espèce de puceron (Hormaphidinae) chez laquelle *B. aphidicola* a été perdue et remplacée par des symbiotes de type levure (Buchner, 1965a ; Fukatsu, *et al.*, 1992 ; Fukatsu, *et al.*, 1994). Ces symbiotes vivent dans l'hémolymphe et occasionnellement envahissent les cellules du corps gras (Buchner, 1965a). Braendle et collaborateurs (2003) ont alors mis en évidence chez ce puceron *T. styraci*, la présence, en position postérieure de l'embryon au stade blastoderme, de noyaux exprimant Dll. Ils montrent que ces noyaux sont aptes à se diviser et deviennent polyploïdes, présentant ainsi toutes les caractéristiques des cellules bactériocytaires. Il apparaît donc que *T. styraci* est capable d'activer le développement précoce des cellules bactériocytaires bien que celles-ci n'hébergent apparemment aucun nouveau symbiote.

Quant au maintien des bactériocytes dans l'hôte, il semblerait, en revanche, que *B. aphidicola* intervienne dans la régulation de ce processus. Braendle et collaborateurs (2003) montrent que le développement précoce des cellules bactériocytaires est initié chez les mâles du puceron *Pemphigus spyrothecae* (présence de l'expression de Dll). Ces pré-bactériocytes disparaissent ensuite avec la poursuite du développement de ces mâles qui ne possèdent pas de bactéries symbiotiques (Buchner, 1965a ; Lampel, 1958).

La symbiose entre les pucerons et *B. aphidicola* est ainsi une forme particulièrement intime de symbiose pour laquelle, la bactérie et la cellule bactériocytaire de l'hôte ont développé des mécanismes originaux afin de former une nouvelle unité fonctionnelle.



## 4 Les besoins nutritionnels des embryons

### 4.1 Production des oocytes et leur approvisionnement

### 4.2 Structures ovariennes à rôle trophique chez le puceron parthénogénétique

### 4.3 Besoins nutritionnels de l'embryon parthénogénétique

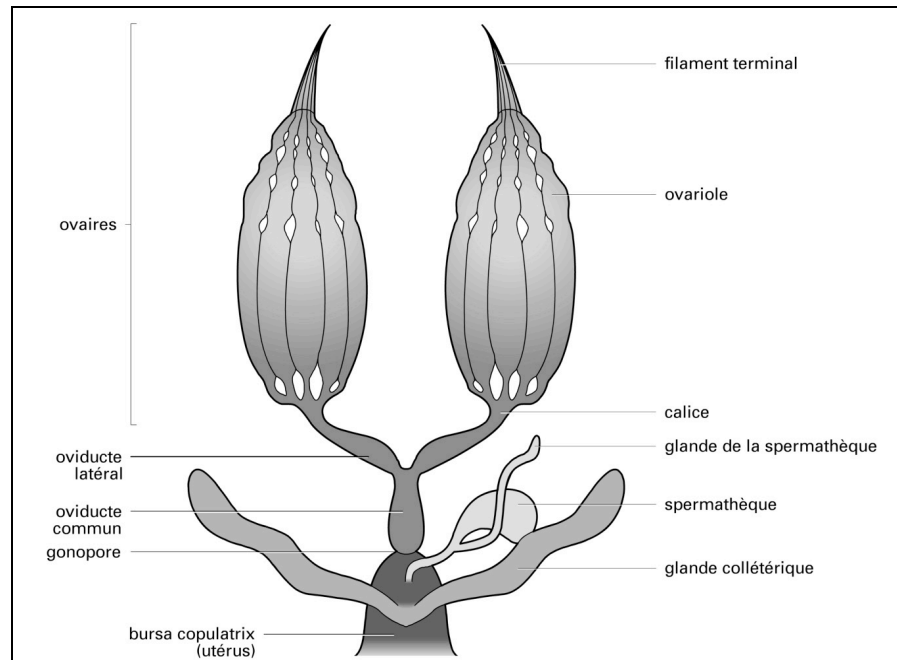
La plupart des œufs d'insectes contient de grandes provisions de substances nutritives pour assurer l'embryogenèse. Puisque l'oogenèse dépend de la nutrition, tout facteur affectant la quantité et/ou la qualité des nutriments acquis par la femelle en période pré-reproductive influencera la production d'œufs.

Chez les insectes, le mode d'approvisionnement des oocytes est caractéristique de chaque type d'ovariole. Dans le cas de la reproduction parthénogénétique chez les pucerons, cet apport de nutriments à l'embryon est en outre d'une part, conditionné par la viviparité et d'autre part, dépendant de la bactérie symbiotique *B. aphidicola*, qui a un rôle nutritionnel pour son hôte et dont la présence est obligatoire pour sa reproduction.

---

### 4.1 Production des oocytes et leur approvisionnement

L'appareil génital femelle des insectes compte deux ovaires, deux oviductes latéraux et un oviducte médian qui débouche dans un atrium génital constitué de zones spécialisées (vagin, bourse copulatrice, poche incubatrice ou utérus) en fonction du mode de reproduction (oviparité, ovoviviparité, viviparité). Spermathèque et glandes accessoires ou collétériques sont en relation avec l'atrium génital (Figure 20).



**Figure 20. Structures de l'appareil génital femelle d'un insecte (d'après l'Encyclopédie Universalis France S.A. 2005).**

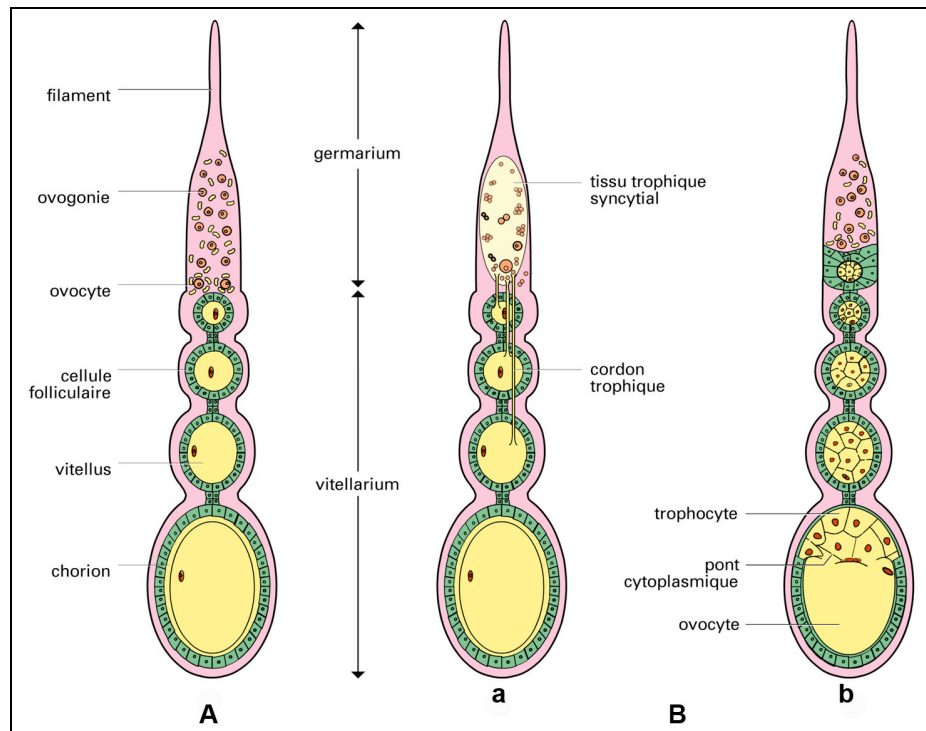
Les ovaires sont composés de plusieurs ovarioles et chaque ovariole comporte le filament terminal en son extrémité, et deux zones fonctionnelles, le germarium apical et le vitellarium. Le germarium héberge les cellules germinales primordiales à l'origine des ovocytes ainsi qu'éventuellement des cellules nourricières ou trophocytes. On y trouve également des cellules d'origine mésodermique qui donneront les cellules folliculaires. L'évolution des cellules germinales permet de distinguer deux catégories d'ovarioles (Figure 21) :

- Le type panoïstique : toutes les cellules germinales évoluent en ovocytes qui seront pondus. Il n'existe pas de cellules nourricières et les éléments nutritifs sont prélevés de l'hémolymphe directement par les ovocytes ou par les cellules folliculaires qui en assurent le transfert (Figure 21A).

- Le type méroïstique : dans ce type, les cellules germinales engendrent par division deux catégories de cellules sœurs, des ovocytes qui évolueront normalement et qui seront pondus et des cellules nourricières qui assurent l'approvisionnement des ovocytes au début de la vitellogenèse puis dégénèrent (Figure 21B). Dans ce type, on distingue :

- Des ovaires télotrophiques (= acrotrophiques) : les cellules nourricières restent accrochées à la partie supérieure du germanium où elles ont pris naissance et assurent l'approvisionnement de l'ovocyte correspondant par l'intermédiaire de longs cordons trophiques. Après la rupture des cordons et la dégénérescence des cellules nourricières, la nutrition des ovocytes est assurée par le follicule (Figure 21B a).

- Des ovaires polytrophiques : chaque ovocyte est accompagné par un nombre spécifique de cellules nourricières (Figure 21B b).



**Figure 21. Les trois types d'ovarioles retrouvés chez les insectes (d'après l'Encyclopédie Universalis France S.A. 2005).**

L'évolution des cellules germinales permet de distinguer deux catégories d'ovarioles : A) le type panoïstique et B) le type méroïstique qui peut être de deux types en fonction du devenir des cellules nourricières : a) type méroïstique télotrophique et b) type méroïstique polytrophique.

#### 4.2 Structures ovariennes à rôle trophique chez le puceron parthénogénétique

Les pucerons possèdent des ovarioles de type méroïstique télotrophique, comportant des trophocytes (cellules nourricières) au sein du germarium et un cordon trophique les reliant aux oocytes et aux embryons précoces. De plus, les oocytes sont entourés par une assise de cellules folliculaires, qui sera ultérieurement perdue chez les embryons parthénogénétiques.

Les trophocytes comportent en leur cytoplasme de nombreux ribosomes libres, mitochondries, vacuoles et un réticulum endoplasmique ainsi qu'un appareil de Golgi assez réduits (Brough, *et al.*, 1989 ; 1990 ; Elliott, *et al.*, 1975 ; Szklarzewicz, *et al.*, 2000). La présence de ces éléments est en accord avec le rôle de sécrétions de substances nutritives (probablement des précurseurs) vers les oocytes en cours de différenciation.



Le cordon trophique reliant les trophocytes aux oocytes est beaucoup plus étroit chez les pucerons vivipares (2-3  $\mu\text{m}$ ) que chez les ovipares (15-20  $\mu\text{m}$ ) (Büning, 1985). Cette structure comporte également de nombreux ribosomes libres, mitochondries et des denses réseaux de microtubules (Büning, 1985 ; Szklarzewicz, *et al.*, 2000). Le péristaltisme mais également des forces électriques et osmotiques pourraient permettre le transport de composés du cytoplasme des trophocytes vers les oocytes (Büning, 1994).

Chez les femelles sexuées ovipares, chaque oocyte est entouré par une couche de cellules folliculaires qui a probablement un rôle trophique pour l'œuf tout au long de sa maturation. En revanche, l'association avec les cellules folliculaires ne s'établit que brièvement chez les vivipares (Brough, *et al.*, 1989 ; Couchman, *et al.*, 1980 ; Orlando, *et al.*, 1968).

Si ces trois structures (trophocytes, cordons trophiques et cellules folliculaires) ont un rôle essentiel dans la maturation des œufs lors de la reproduction sexuée, leur rôle est plus limité dans le développement des embryons parthénogénétiques. Chez ces derniers, en effet, la connexion par les cordons trophiques est perdue au stade blastoderme et l'embryon est libéré de son enveloppe folliculaire. A partir de cette étape du développement, l'embryon parthénogénétique doit, pour garantir sa croissance rapide, puiser les nutriments dont il a besoin en grande quantité dans d'autres tissus trophiques. Une première source d'éléments nutritifs pour les embryons parthénogénétiques est représentée par la gaine ovarienne. Dans la région proche du germarium, ce tissu forme un feuillet très fin, dépourvu de fonction trophique (Büning, 1994). La gaine est plus épaisse autour des embryons et l'abondance de mitochondries, ribosomes, réticulum endoplasmique et appareils de Golgi, indique que cette structure pourrait fournir aux embryons des petits métabolites, de l'énergie ou encore des protéines. Néanmoins, il est peu probable que la gaine ovarienne soit suffisante à elle seule pour approvisionner l'embryon avec une grande quantité de nutriments, car cette structure est fortement réduite chez le puceron en comparaison avec des structures homologues présentes chez d'autres insectes (Büning, 1994). Toutefois, en raison de la structure particulière de la gaine ovarienne chez les pucerons (formée de cellules présentant de nombreuses jonctions lacunaires intercellulaires), il est admis qu'elle ait aussi un rôle actif dans le transport de nutriments de la mère à l'embryon (Bermingham, *et al.*, 2009a).

Il est enfin à remarquer que, pendant le développement des embryons parthénogénétiques chez le puceron du pois, la perte de connexion avec les structures trophiques du germarium se fait simultanément avec la transmission des *B. aphidicola* de la mère à

l'embryon, bien qu'on ne sache pas si les deux événements se contrôlent réciproquement (Bermingham, *et al.*, 2009a).

L'ensemble de ces observations suggère que, durant le développement des embryons parthénogénétiques, à partir du stade blastoderme, les nutriments essentiels à la croissance embryonnaire dérivent potentiellement des compartiments suivants : la gaine ovarienne (qui aurait également un rôle dans l'échange de nutriments entre la mère et les embryons), les tissus maternels via l'hémolymphe, tel le corps gras ou plus spécifiquement le compartiment symbiotique maternel, ou encore *in fine*, le compartiment symbiotique embryonnaire.

A ce jour, le rôle de ces différents tissus/compartiments dans la fourniture de nutriments aux embryons de puceron au cours de la parthénogenèse est encore très peu connu.

---

### 4.3 Besoins nutritionnels de l'embryon parthénogénétique

Pendant la reproduction parthénogénétique, les embryons de puceron connaissent une croissance spectaculaire et il est ainsi admis que leurs besoins nutritionnels, surtout en acides aminés, sont très importants (Bermingham, *et al.*, 2009b ; Douglas, 1996 ; Wilkinson, *et al.*, 1999). Bien que cette reproduction soit considérée comme l'un des facteurs contribuant le plus au potentiel des pucerons à agir comme de redoutables ravageurs des cultures en climat tempéré, seul un nombre limité d'études a été consacré à la physiologie nutritionnelle des embryons de puceron.

Une première étude, réalisée par Douglas (1996), a comparé les adultes et les ovaires (contenant la grappe embryonnaire) de pucerons symbiotiques et de pucerons rendus aposymbiotiques par traitement antibiotique. Cette étude montre que la croissance des embryons est beaucoup plus affectée que celle des larves ou des adultes par l'élimination de *B. aphidicola*. Cela indique que les embryons dépendent plus de la bactérie symbiotique (et probablement de sa fourniture en acides aminés) que les tissus maternels. La comparaison du profil de concentration de différents acides aminés entre les différents groupes analysés dans cette étude met en évidence que les besoins métaboliques des ovaires sont différents des besoins métaboliques de l'ensemble des tissus des adultes. La réduction de la croissance observée pour les embryons aposymbiotiques semble être due à une quantité insuffisante de deux acides aminés essentiels : le tryptophane et la phénylalanine (Douglas, 1996).

Cette étude souligne l'importance de la contribution de la bactérie symbiotique et de son apport en certains acides aminés au développement

embryonnaire du puceron du pois. Elle indique également la nécessité d'étudier la nutrition embryonnaire de manière indépendante de la nutrition maternelle chez cet insecte. Telle qu'elle a été conduite, cette étude ne permet pas de comprendre si les acides aminés importants pour le développement embryonnaire proviennent du compartiment symbiotique maternel ou embryonnaire. Enfin, elle ne permet pas non plus d'évaluer si les besoins métaboliques des embryons évoluent au cours du développement.

Wilkinson et Ishikawa (1999) ont ensuite analysé le devenir dans les tissus du puceron d'un nombre restreint d'acides aminés (les non essentiels glutamate et tyrosine et les essentiels phénylalanine, lysine et thréonine) marqués au  $^{14}\text{C}$  et injectés dans l'hémocèle de l'insecte. La première conclusion de cette étude est que les acides aminés de l'hémocèle sont détournés par les embryons, mais ceci de manière sélective. En effet, les acides aminés marqués sont détectés dans les embryons à des proportions variant de 35 % à 100 %. Cela montre, pour la première fois, que les embryons peuvent puiser dans les réserves maternelles pour s'approvisionner en acides aminés. La deuxième conclusion est que, de tous les acides aminés suivis dans cette étude par radiotraçage, la phénylalanine représente un acide aminé important pour le développement des embryons de puceron, car la totalité de la radioactivité se retrouve cumulée dans la fraction embryonnaire des pucerons symbiotiques.

Dans une seconde étude, Wilkinson et Ishikawa (2000) simulent l'approvisionnement en acides aminés par *B. aphidicola* en injectant des acides aminés (glutamine, lysine, tryptophane, phénylalanine ou un mélange contenant tous les acides aminés essentiels) dans l'hémocèle de pucerons symbiotiques et aposymbiotiques. Vingt-quatre et 72 heures après injection, le nombre d'embryons ainsi que la taille des plus grands embryons ne sont pas altérés par le traitement dans le groupe des pucerons symbiotiques. En revanche, l'injection de certains acides aminés (tryptophane, phénylalanine et le mélange d'acides aminés essentiels) provoque une augmentation significative du nombre d'embryons chez les pucerons aposymbiotiques : le nombre moyen d'embryons dans les pucerons aposymbiotiques passe alors d'environ 12 dans les pucerons non injectés à 25-30 dans les pucerons injectés. Aucun de ces traitements ne rétablit cependant la condition symbiotique (environ 40 embryons chez un puceron symbiotique) et n'a d'effet sur la taille des plus gros embryons. Ces observations confirment, comme l'étude précédente, i) le grand impact de la fourniture en acides aminés essentiels par la bactérie symbiotique sur la reproduction parthénogénétique et ii) que les embryons sont capables de puiser les acides aminés essentiels dont ils ont besoin dans les tissus

maternels. Elle montre également que *B. aphidicola* doit fournir d'autres éléments nutritifs que les acides aminés aux embryons (incapacité de l'injection d'un mélange d'acides aminés essentiels à rétablir le phénotype « symbiotique »). Elle souligne enfin que les embryons dans des stades avancés du développement seraient davantage isolés des compartiments maternels et ne seraient ainsi plus capables d'assimiler les acides aminés essentiels d'origine maternelle.

Plus récemment Bermingham et Wilkinson (2010) ont étudié le rôle des bactéries symbiotiques embryonnaires dans la fourniture d'acides aminés aux embryons du puceron *Aphis fabae*. Pour cela, des embryons (de 250 à 500  $\mu\text{m}$  de long) ont été isolés de la mère pour être maintenus en culture dans un milieu complet ou dans différents milieux carencés en acides aminés pendant 24 h. Les auteurs ont montré qu'il n'y avait aucune différence pour la croissance sur milieu complet, entre des embryons aposymbiotiques (obtenus à partir de mères rendues aposymbiotiques par traitement antibiotique) et des embryons symbiotiques. En revanche, les taux de croissance observés avec un milieu dépourvu d'acides aminés essentiels sont significativement inférieurs à ceux obtenus avec le milieu complet pour les deux groupes d'embryons. Cette observation, souligne à nouveau le fort besoin en acides aminés essentiels des embryons de puceron pour leur croissance. Les auteurs ont ensuite tenté de définir quels acides aminés essentiels pouvaient être limitants pour la croissance embryonnaire et ceci en cultivant les embryons dans des milieux carencés en un seul des acides aminés essentiels. L'absence de l'un des trois des acides aminés valine, phénylalanine et tryptophane est limitante pour la croissance des embryons comparativement à la croissance sur milieu complet. Pour la valine et la phénylalanine, aucune différence significative des taux de croissance entre embryons symbiotiques et aposymbiotiques n'a été observée. Ce résultat suggérerait que les forts besoins en ces acides aminés seraient en majorité comblés par des apports maternels. En revanche, pour le tryptophane, il a été observé une plus faible croissance chez les aposymbiotiques, laissant supposer un rôle des bactéries symbiotiques embryonnaires dans la fourniture de cet acide aminé nécessaire à la bonne croissance de l'embryon.

L'ensemble de ces études répond à la question du rôle des acides aminés dans la croissance des embryons pathénogénétiques, en soulignant en particulier la forte dépendance de ces embryons à la fourniture de ces nutriments par la bactérie symbiotique *B. aphidicola*. De nombreuses questions restent toutefois ouvertes. Bien que certains acides aminés essentiels (phénylalanine, tryptophane et valine) semblent être plus

limitants que d'autres pour la croissance des embryons parthénogénétiques, une seule étude (sur le puceron *A. fabae*) a analysé la contribution des différents compartiments symbiotiques (maternels ou embryonnaires) à leur fourniture aux embryons (Bermingham, *et al.*, 2010). A l'heure actuelle, aucune étude n'a caractérisé les besoins nutritionnels des embryons parthénogénétiques tout au long de leur développement. Enfin, bien que l'étude de Wilkinson et Ishikawa (2000) révèle que des composés, autres que les acides aminés, pourraient également être essentiels au développement des embryons de puceron, aucune étude n'a cherché pour le moment à les caractériser. Ces différentes questions ont pu être abordées au cours de ma thèse.

# Partie II - Matériel et Méthodes



# 1 Le matériel biologique

## 1.1 Les pucerons : élevage de masse et élevage synchronisé

### 1.2 Les embryons : caractérisation et isolement

---

## 1.1 Les pucerons : élevage de masse et élevage synchronisé

---

### 1.1.1 L'élevage de masse

Les pucerons utilisés dans ce travail sont issus d'un même clone parthénogénétique d'*Acyrtosiphon pisum* (Harris), établi en 1986 à partir d'une infestation en champ de luzerne et enregistré sous le nom Ap-LL01 (Rahbé, *et al.*, 1988). Comme nos études sont focalisées sur le métabolisme du puceron et son interaction avec le symbiote primaire *B. aphidicola*, notre choix s'est porté sur ce clone car il est dépourvu de symbiotes secondaires. Ceci permet d'éviter toute interférence avec les symbiotes secondaires et tout risque de contamination par du matériel biologique issu de ces derniers. Les pucerons sont élevés et maintenus sur de jeunes plants de fève (*Vicia faba* L. variété Aquadulce) en insectarium dans des conditions contrôlées [température de  $21 \pm 1^\circ\text{C}$ , humidité relative de  $70 \pm 10\%$ ] et une photopériode de 16 h / 8 h (jour / nuit) afin d'obtenir uniquement des femelles se reproduisant par parthénogénèse.



**Figure 22. Elevage de masse d'*A. pisum* sur jeune plant de *Vicia faba*.**  
Différents stades de développement se côtoient sur un même plant ainsi que des formes aptères ou ailées (non présent sur cette photographie)



---

### 1.1.2 L'élevage synchronisé

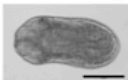

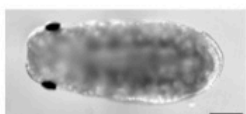

Pour la réalisation des expérimentations, les pucerons sont choisis à des stades physiologiques de développement précisément définis. Ceci est réalisé en plaçant, à faible densité, des femelles adultes ailées parthénogénétiques et vivipares sur des jeunes plants de fève pendant 24 heures. Les larves pondues durant cette période (larves du 1<sup>er</sup> stade = L1) sont synchronisées et, étant issues de femelles ailées, elles deviendront toutes des femelles parthénogénétiques aptères (cf Introduction §1.1 p 35). Elles sont maintenues sur les plantes durant 10 jours, jusqu'à atteindre le stade adulte aptère utilisé pour les dissections et l'isolement des embryons.

Certaines études sont également réalisées sur des larves L1, dont l'âge diffère selon les expérimentations. Pour les analyses transcriptomiques, les larves L1 sont pondues par les femelles ailées sur une période de 24 h (comme décrit ci-dessus) et sont donc âgées de  $12 \pm 12$  h (entre 0 et 24 h). Pour les analyses des acides aminés, deux groupes de larves L1 sont considérés. Les larves L1 dites précoces, âgées entre 0 et 6 h, sont pondues par les femelles pendant une période de 6 h et immédiatement récoltées. Les larves L1 dites tardives, sont âgées entre 13 et 19 h ; elles sont également pondues par les femelles pendant une période de 6 h puis maintenues sur les plantes durant 13 h avant d'être prélevées.

---

## 1.2 Les embryons : caractérisation et isolement

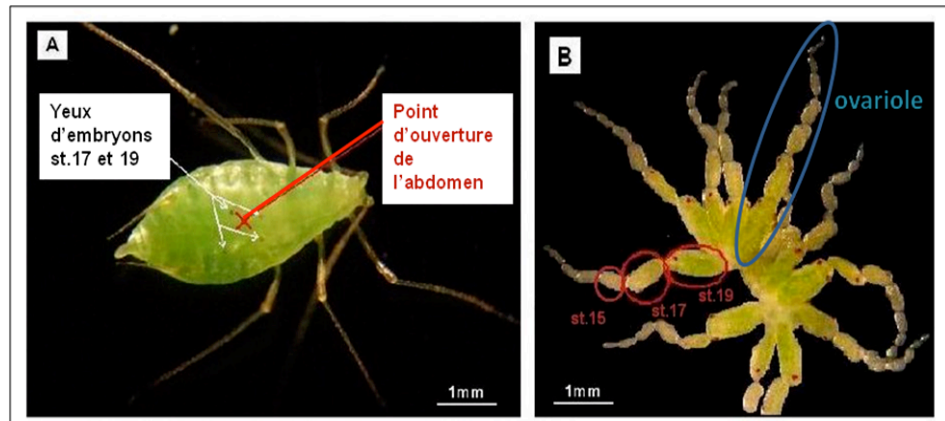
Trois différents groupes de stades embryonnaires sont utilisés dans ce travail. Ils sont identifiés en fonction de leur taille et caractérisés aussi à l'aide d'autres critères morphologiques tels que leur position dans l'ovariole, l'intensité de la pigmentation du corps ou des yeux et la taille des yeux. Les trois groupes se composent des embryons précoces [EE (early embryos) :  $\leq 0,4$  mm], des embryons intermédiaires [IE (intermediate embryos) : 0,4 à 0,8 mm] et des embryons tardifs [LE (late embryos) :  $> 0,8$  mm] (Birmingham, *et al.*, 2009b) correspondant respectivement aux stades  $\leq 16$ , 17-18 et 19-20 décrits par Miura et collaborateurs (2003).

	Groupe	Stade de développement	Taille ou poids	Caractéristiques morphologiques ou durée de développement	Microphotographie
Embryons	Embryons précoces (EE)	0-16	$\leq 400 \mu\text{m}$	* Très peu pigmentés * Les yeux ne sont pas visibles à la loupe	
		15-16	$400 \mu\text{m}$		
	Embryons intermédiaires (IE)	17-18	$400-800 \mu\text{m}$	* Corps pigmenté * Les yeux commencent à être visibles	
	Embryons tardifs (LE)	19-20	$> 800 \mu\text{m}$	* Corps pigmenté * Les yeux sont très distinctement visibles	
Larves	Larve de 1 <sup>er</sup> stade (L1)	1 <sup>er</sup>	$\leq 0.2 \text{ mg}$	0-6 heures	
				13-19 heures	
				0-24 heures	

**Figure 23. Présentation des quatre stades de développement étudiés.**

Dans chaque groupe, les individus étudiés sont définis par leur stade de développement, leur taille ainsi que par des caractéristiques morphologiques. Sur les microphotographies, les barres d'échelle représentent une longueur de  $200 \mu\text{m}$ .

Afin d'isoler les embryons, les pucerons sont disséqués sous loupe binoculaire dans un tampon A [35 mM Tris-HCl (pH 7,5), 25 mM KCl, 10 mM  $\text{MgCl}_2$ , 250 mM saccharose, DEPC (1/1000)]. Ce tampon est versé dans une boîte de Petri dont le fond est recouvert d'un gel d'agarose (1,5 %) afin d'éviter l'adhérence des tissus au verre. Les pucerons sont délicatement ouverts au milieu de l'abdomen à l'aide de deux pinces fines et les ovaires sont isolés (Figure 24A). Les femelles parthénogénétiques possèdent deux ovaires formés chacun de 6 à 7 ovarioles. Chaque ovariole renferme plusieurs embryons à différents stades de leur développement. Les stades les plus précoces se situent à l'extrémité de l'ovariole et les stades les plus avancés au centre des ovaires (Figure 24B).



**Figure 24. Détermination de la zone de dissection dans une femelle parthénogénétique vivipare de puceron du pois afin d'isoler les deux ovaires.**

**A)** Zone d'ouverture de l'abdomen du puceron et localisation des embryons à isoler.

**B)** Les 2 ovaires isolés. Chaque ovaire compte de 6 à 7 ovarioles. Au centre des ovaires, on observe les embryons ayant atteint le stade de développement le plus avancé (Stades 19-20).

Les embryons IE et LE sont individuellement prélevés de l'ovariole : cette dernière est coupée à proximité de la tête de l'embryon à isoler, puis, en maintenant immobile l'ovariole avec une pince, l'embryon est délicatement expulsé par le site de coupure. Il est en revanche plus difficile de séparer les embryons précoces (EE) de la gaine ovarienne. Pour l'analyse des acides aminés réalisée sur les embryons de stades inférieurs ou égaux à 15, l'ovariole est sectionnée de sorte à éliminer tous les embryons IE et LE et la partie restante de la chaîne embryonnaire (renfermant les jeunes embryons) est prélevée. Pour les expériences de culture *in vitro* et les analyses transcriptomiques, seuls les embryons de stade 15 (EE mesurant environ 400  $\mu\text{m}$ ) sont isolés en sectionnant l'ovariole de part et d'autre de l'embryon choisi. Les embryons isolés ou les chaînes embryonnaires sont ensuite manipulés à l'aide d'une pipette stérile en verre à pointe fine équipée d'une micro-poire.

## 2 Analyse des besoins en acides aminés du puceron du pois au cours du développement

2.1 Evolution du contenu en acides aminés au cours du développement

2.2 Développement *in vitro* des embryons

---

### 2.1 Evolution du contenu en acides aminés au cours du développement

---

#### 2.1.1 Choix et préparation des échantillons

Pour la quantification des acides aminés totaux (AAT) et des acides aminés libres (AAL), 5 types d'échantillons sont récoltés à raison de 4 répétitions biologiques par groupes.

Les 5 groupes analysés sont constitués par :

- Les embryons précoces (EE) = 20 "queues" de chaînes embryonnaires (cf matériel et méthodes §1.2 p 90) par répétition.
- Les embryons intermédiaires (IE) = 15 embryons de 400 à 800  $\mu\text{m}$  par répétition.
- Les embryons tardifs (LE) = 15 embryons d'au moins 800  $\mu\text{m}$  par répétition.
- Les larves L1 précoces = 15 larves (âgées de 0 à 6 h) par répétition
- Les larves L1 tardives = 15 larves (âgées de 13 à 19 h) par répétition.
- Les adultes = 1 individu par répétition

Pour la préparation de ces échantillons, nous avons utilisé un nouveau tampon (tampon B) composé de 162,75 mM KCl, 10 mM  $\text{CaCl}_2$ , 25 mM  $\text{MgCl}_2$ , 13,75 mM acide citrique et 38,75 mM NaOH. Ce tampon présente l'avantage de ne pas contenir de trishydroxyméthylaminométhane (Tris), qui interfère avec l'analyse des acides des acides aminés par chromatographie en phase liquide (distorsion et retard des pics d'éluion). Après isolement, les embryons sont rincés par trois centrifugations à 800 g à 4°C durant 2 min dans du tampon B afin d'éliminer toute contamination provenant de la mère.

---

### 2.1.2 Extraction des acides aminés

Les échantillons sont broyés dans un volume final de 320  $\mu\text{l}$  constitué d'eau ultra pure et de 16  $\mu\text{l}$  d'une solution à 2,5 mM de norvaline (standard interne) puis homogénéisés aux ultrasons pendant 10 minutes. Deux aliquotes sont réalisées, l'une de 80  $\mu\text{l}$  pour l'extraction des acides aminés totaux, l'autre de 200  $\mu\text{l}$  pour l'extraction des acides aminés libres.

Dans le premier cas, l'échantillon est séché sous vide (Speed-Vac, Savant Instrument, Farmingdale, NY, USA), hydrolysé à 110°C pendant 24 h sous vapeur d'acide chlorhydrique (Pico-Tag Station, Waters, Guyancourt, France) puis conservé à -20°C avant analyse.

Pour l'analyse des acides aminés libres, 200  $\mu\text{l}$  d'acide trichloroacétique (TCA) 10 % sont ajoutés aux 200  $\mu\text{l}$  de broyat afin d'éliminer les peptides et les protéines par précipitation (centrifugation de 10 min à 6000 g à 4°C et récupération du surnageant dans un tube propre). Afin d'éliminer le TCA qui perturbe la chromatographie, trois extractions successives avec 400  $\mu\text{l}$  de chloroforme sont réalisées. A chaque extraction, la phase inférieure (aqueuse) est récupérée. L'extrait final est séché sous vide (Speed-Vac) et conservé à -20°C avant analyse.

---

### 2.1.3 Analyse et quantification des acides aminés par HPLC

L'analyse des acides aminés est réalisée par chromatographie en phase liquide sur une chaîne HPLC Agilent 1100 (Agilent Technologies, Massy, France) équipée d'un détecteur à barrettes de diodes. La séparation des acides aminés est effectuée par chromatographie en phase inverse après dérivation des acides aminés de l'échantillon à analyser, par l'orthophthalaldéhyde (OPA) pour les acides aminés primaires et le 9-fluorénylméthyl chloroformate (FMOC) pour les acides aminés secondaires (proline). Les conditions chromatographiques sont celles préconisées par le fabricant pour ce type d'analyse (Henderson, *et al.*, 2000) : colonne Zorbax Eclipse-AAA de dimensions 4,6 x 150 mm avec des particules de 3,5  $\mu\text{m}$  ; phase mobile constituée d'un gradient de tampon phosphate (40 mM  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  pH 7,8) et de mélange acétonitrile/méthanol/eau (45:45:10 v/v/v) avec un flux de 2 ml/min. Les acides aminés sont détectés et quantifiés par leur absorption en UV à 338 nm pour les acides aminés primaires dérivés à l'OPA et à 262 nm pour les acides aminés secondaires dérivés au FMOC. Le facteur de réponse de chaque acide aminé est déterminé grâce à des standards externes (mélange de tous les acides aminés classiques) en concentrations connues. La quantification des acides aminés dans les échantillons est corrigée des pertes et rendement par l'incorporation, dès le

broyage des tissus à analyser, d'une quantité connue d'un standard interne (norvaline, acide aminé non présent naturellement dans nos échantillons biologiques).

Selon les échantillons analysés, cette quantification fournit les concentrations en acides aminés totaux (AAT) pour les échantillons hydrolysés ou en acides aminés libres (AAL) après précipitation des protéines. Les concentrations en acides aminés protéiques (AAP) sont calculées par différence sur un même échantillon entre les concentrations en AAT et en AAL. Compte tenu de la masse molaire de chaque acide aminé, les concentrations d'AAP permettent de calculer la teneur globale en protéines de l'échantillon.

---

## 2.2 Développement *in vitro* des embryons

---

### 2.2.1 Milieux et conditions de culture

Afin de choisir le milieu le mieux adapté à la mise en culture des embryons, trois milieux de culture sont testés (Tableau 2) :

- le milieu de culture GRS (Grace's Insect Medium, Eurobio, Courtaboeuf, France) se compose de 10 vitamines, 6 sels inorganiques, 4 sels organiques, 21 acides aminés et 3 sucres. Il est couramment utilisé pour la culture de cellules d'insecte (Darby, *et al.*, 2006).
- Le milieu GAp3 se compose du milieu GRS complétement en acides aminés de manière à calquer la composition en acides aminés du milieu Ap3 (milieu artificiel mis au point pour l'élevage du puceron du pois et reproduisant la composition en acides aminés de ce dernier) (Febvay, *et al.*, 1999).
- Le milieu GSVF se compose du milieu GRS et de 10 % de sérum de veau fœtal (SVF) (Eurobio), complément couramment utilisé pour la culture d'embryons.

La formulation des deux premiers milieux diffère seulement pour leurs concentrations en acides aminés (Tableau 2), alors que le milieu GSVF contient d'autres composés, comme des vitamines et aussi des hormones, provenant du sérum de veau, mais dont la composition exacte n'est pas définie.

**Tableau 2. Composition des différents milieux de culture testés.**

	<b>GRS</b>	<b>GAp3</b>	<b>GSVF</b>
<i>Composants principaux</i>	<b>mM</b>	<b>mM</b>	<b>mM</b>
<b>Acides aminés</b>			
Alanine	4,78	20,06	4,78
Béta-Alanine		0,7	
Arginine	3,32	14,06	3,32
Asparagine H <sub>2</sub> O	2,65	19,88	2,65
Acide Aspartique	2,63	6,63	2,63
Cystéine		2,44	
Cystine	0,0916		0,0916
Acide Glutamique	4,08	10,15	4,08
Glutamine	4,11	30,49	4,11
Glycine	8,67	22,19	8,67
Histidine HCl H <sub>2</sub> O	16,13	6,49	16,13
Isoleucine	0,382	12,56	0,382
Leucine	0,573	17,65	0,573
Lysine HCl	3,42	19,22	3,42
Méthionine	0,336	4,85	0,336
Ornithine HCl		0,56	
Phénylalanine	0,909	17,83	0,909
Proline	3,04	11,23	3,04
Sérine	5,24	11,83	5,24
Thréonine	1,47	10,67	1,47
Tryptophane	0,49	2,09	0,49
Tyrosine	0,276	2,13	0,276
Valine	0,855	16,29	0,855
<b>Vitamines</b>	<b>mg/l</b>	<b>mg/l</b>	<b>mg/l</b>
Acide p-aminobenzoïque	0,01	0,01	0,01
Biotine	0,2	0,2	0,2
d-Panathénate de Calcium	0,02	0,02	0,02
Chlorure de Choline	0,02	0,02	0,02
Acide Folique	0,02	0,02	0,02
i-Inositol Anhydre	0,02	0,02	0,02
Amide Nicotinique	0,02	0,02	0,02
Pyridoxine HCl	0,02	0,02	0,02
Riboflavine	0,02	0,02	0,02
Thiamine HCl	0,02	0,02	0,02
<b>Sels inorganiques</b>	<b>mM</b>	<b>mM</b>	<b>mM</b>
Chlorure de Calcium (CaCl <sub>2</sub> )	4,5	4,5	4,5
Chlorure de Magnésium	11,26	11,26	11,26
Sulfate de Magnésium (MgSO <sub>4</sub> )	11,32	11,32	11,32
Chlorure de Potassium (KCl)	37,33	37,33	37,33
Bicarbonate de Sodium (NaHCO <sub>3</sub> )	4,17	4,17	4,17
Phosphate de Sodium monobasique (NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> -H <sub>2</sub> O)	7,34	7,34	7,34
<b>Autres composés</b>	<b>mM</b>	<b>mM</b>	<b>mM</b>
Saccharose	78,01	78,01	78,01
D-Fructose	2,22	2,22	2,22
D-Glucose	3,89	3,89	3,89
Acide α-ketoglutarique	2,53	2,53	2,53
Acide Furamique	0,474	0,474	0,474
Acide Malique	5	5	5
Acide Succinique	0,508	0,508	0,508
<b>Sérum de veau fœtal</b> (Eurobio, Courtaboeuf, France)	0	0	10 %

Les milieux de culture sont préparés de manière stérile sous une hotte à flux laminaire horizontal. Après avoir été complétement avec les acides aminés, le milieu GAp3 est filtré stérilement (filtre 0,22  $\mu\text{m}$ ).

Les embryons sont mis en culture dans des microplaques de 6 puits. Dans chaque puits, un embryon est immergé dans 1 ml de milieu de culture. Les microplaques sont ensuite placées en étuves stérilisées dont l'environnement contrôlé reproduit les conditions d'élevage des adultes [température de  $21 \pm 1^\circ\text{C}$ , humidité relative de  $70 \pm 10\%$ , photopériode de 16 h / 8 h (jour / nuit)]. Les embryons sont maintenus en culture durant 72 h. Toutes les 24 h, les embryons sont examinés sous loupe binoculaire et le milieu de culture est renouvelé afin de limiter les contaminations microbiennes.

---

### 2.2.2 Suivi du développement

Afin de déterminer leur viabilité et leur capacité à se développer *in vitro* dans les milieux, les embryons sont suivis individuellement et quotidiennement au microscope en contraste de phase (Olympus IX-81, Rungis, France) et photographiés par le système de caméra relié au microscope. Différents critères sont pris en compte : 1) l'existence de mouvements de contractions, 2) l'apparition ou l'accentuation de la pigmentation, 3) l'apparition des yeux ou leur développement, 4) l'évolution de la taille des embryons. Ce dernier paramètre a été précisément mesuré sur les microphotographies avec le logiciel cell<sup>^</sup>F (Olympus).

---

### 2.2.3 Composition en acides aminés des embryons mis en culture

L'analyse de la composition en acides aminés des embryons mis en culture est réalisée sur les embryons LE, plus faciles à manipuler et montrant les meilleurs taux de croissance en milieu de culture. Soit lors de la mise en culture (lot contrôle à J0) soit à l'issue des 72 h de culture (J3), les embryons en bon état de santé sont prélevés par aspiration (cf. Matériel et Méthodes : §1.2 p 90). Ils sont groupés par lot de 15 dans des tubes eppendorf, puis ils sont rincés avec du tampon B (cf. Matériel et Méthodes §2.1.1 p 93) pour éliminer toutes traces d'acides aminés exogènes apportés par le milieu et pouvant fausser les résultats lors de l'analyse par HPLC. Les échantillons sont ensuite traités comme cela est décrit pour les échantillons *in vivo* (cf. Matériel et Méthodes §2.1.2 p 94 et §2.1.3 p 94).





## 3 Analyse du transcriptome du puceron du pois au cours de son développement embryonnaire et larvaire

### 3.1 Réalisation des puces à ADN

### 3.2 Choix et préparation des échantillons

### 3.3 Extraction et préparation des acides nucléiques

3.4

---

### Acquisition et traitement des données de puces à ADN

### 3.5 Analyse statistique des données de puce à ADN

### 3.6 Validation des données de puce par RT-PCR

---

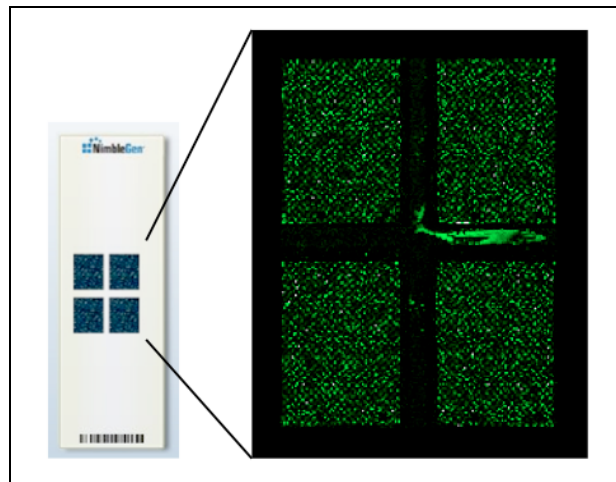
### 3.1 Réalisation des puces à ADN

Le récent projet de séquençage et annotation du génome du puceron du pois a permis la mise en place d'une première étude, à large échelle, du transcriptome de cet insecte (IAGC, 2010). La puce à ADN « ACYPI v1.0 », développée dans notre unité par Stefano Colella, en collaboration avec Nimblegen, est la première puce à oligonucléotides dédiée au génome du puceron du pois. Pour la réalisation de cette puce, différentes raisons ont orienté notre choix vers la technologie NimbleGen. Tout d'abord, ces puces ont largement prouvé leurs performances dans de nombreuses applications transcriptomiques (première publication : (Nuwaysir, *et al.*, 2002), autres publications :

<http://www.nimblegen.com/pubsearch/index.html?filter=expression>). De plus, la technologie NimbleGen offre la possibilité de produire des puces à haute densité en sondes oligonucléotidiques, ce qui permet, de réaliser une bonne couverture d'un génome comme celui du puceron du pois et/ou d'hybrider de multiples échantillons en parallèle sur une même puce, entraînant une baisse significative du coût expérimental par rapport à d'autres technologies de fabrication de puces à ADN. Enfin, la technologie NimbleGen offre la possibilité de produire de nouvelles versions de la

même puce en ajoutant de nouvelles sondes à une version de base, au fur et à mesure de l'avancement de la caractérisation de nouveaux gènes dans un génome. Ceci est particulièrement utile pour l'étude des génomes nouvellement séquencés (comme celui du puceron du pois) qui peut nécessiter de nouvelles étapes de séquençage et de nombreuses améliorations des annotations, notamment durant les premières années suivant le premier séquençage.

La puce « ACYPI v1.0 » permet d'accueillir 4 échantillons indépendants, en raison de ses 4 sections contenant chacune 72 000 sondes (Figure 25). Le design de la puce a été réalisé de sorte à obtenir, en règle générale, 3 sondes de 60-mer par transcrit. Ceci correspond dans notre cas à 24 011 transcrits (soit 23 855 des 34 604 gènes présents dans le génome du puceron du pois). Les gènes représentés sur la puce sont constitués des 22 542 gènes les mieux annotés du puceron du pois, complétés avec 1 313 gènes non annotés mais possédant des transcrits de grande taille et ayant donc potentiellement une fonction. Afin de pouvoir vérifier la qualité de la puce ainsi que d'évaluer le bruit de fond lors des hybridations, chaque lame dispose d'environ 5000 sondes contrôles supplémentaires utilisées par NimbleGen lors de l'acquisition et du traitement des images ainsi de la normalisation de données.



**Figure 25.** Puce à ADN NimbleGen 4x72K « ACYPI v1.0 ».

A gauche, la représentation d'une lame comportant 4 sections de 72 000 sondes. A droite, un exemple d'image présentant en vert les transcrits fixés aux sondes. Cette image est obtenue après hybridation de la lame avec des ADNc marqués à la cyanine Cys3 et lecture dans un scanner.

### 3.2 Choix et préparation des échantillons

L'analyse du transcriptome d'*A. pisum* est réalisée au cours du développement sur 4 groupes d'embryons :

- Les embryons EE mesurant environ 400  $\mu\text{m}$  (stade 15 et 16)
- Les embryons IE mesurant entre 400 et 800  $\mu\text{m}$  (stades 17 et 18)
- Les embryons LE mesurant plus de 800  $\mu\text{m}$  (stades 19 et 20)
- Les larves L1 âgées de 0 à 24 h (cf. Matériel et Méthodes : §1.1 p 90).

Trois répétitions indépendantes par groupe sont réalisées à raison de 60 embryons EE, 30 embryons IE ou LE et 30 larves L1 par répétition.

Les embryons sont isolés à partir de femelles adultes aptères âgées de 10 jours comme décrit précédemment (cf. Matériel et Méthodes : §1.2 p 90). Après dissection, les embryons sont transférés dans des tubes Eppendorf de 1,5 ml, et rincés 3 fois avec 0,5 ml de tampon A (centrifugation à 800 g à 4°C pendant 2 min et élimination du tampon à chaque rinçage). Les échantillons sont stockés à -80°C en attendant l'extraction des ARN totaux.

---

### 3.3 Extraction et préparation des acides nucléiques

---

#### 3.3.1 Extraction des ARN totaux

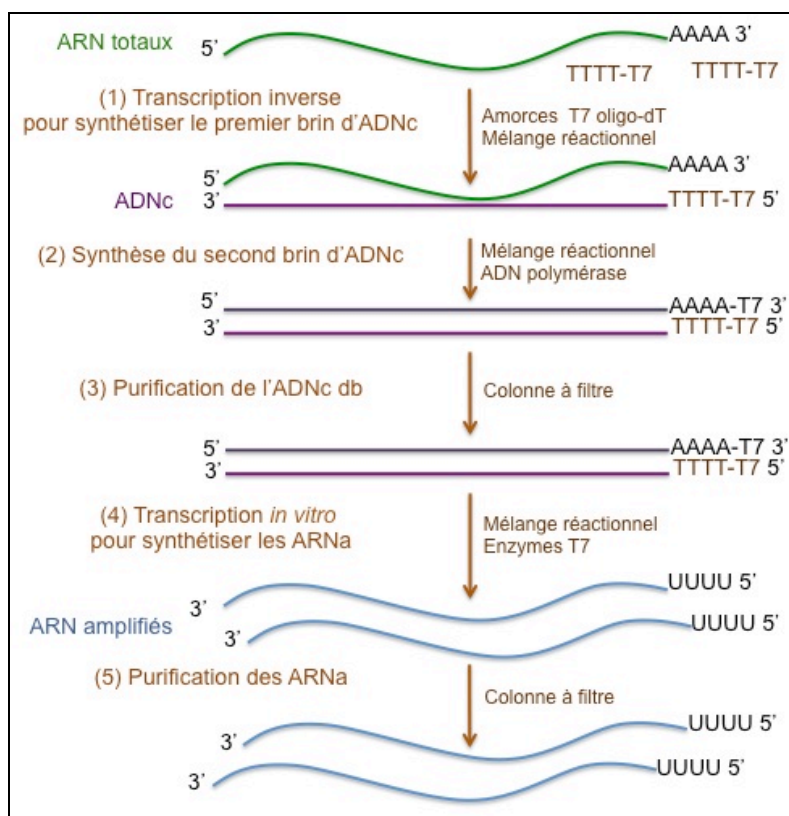
Les ARN totaux sont isolés à l'aide du kit « RNeasy Mini » (Qiagen, Hilden, Allemagne), en utilisant le protocole « Animal tissues ». Les embryons sont d'abord traités au  $\beta$ -mercaptoéthanol 1 % dans le tampon de lyse RLT (contenant de la guanidine, permettant la dénaturation des protéines) fourni dans le kit et broyés à l'aide d'un homogénéisateur électrique. Après ajout de 250  $\mu\text{l}$  d'éthanol absolu (précipitation des acides nucléiques), les lysats sont passés au travers d'une colonne à filtre de silice retenant les ARN totaux. Les échantillons sont ensuite soumis à différentes étapes de purification (700  $\mu\text{l}$  de tampon RW1 puis 2 fois 500  $\mu\text{l}$  de tampon RPE) sur colonne. Les ARN totaux sont finalement élués avec 30  $\mu\text{l}$  d'eau dépourvue de RNase (fournie dans le kit).

---

#### 3.3.2 Production des ADN double brin

Les ARN messagers eucaryotes sont sélectivement amplifiés en utilisant le kit « MessageAmp<sup>TM</sup> II aRNA amplification » (Ambion, Austin, TX, USA). L'amplification comprend 5 étapes (Figure 26) : (1) une reverse-transcription utilisant 1  $\mu\text{g}$  d'ARN totaux et 1  $\mu\text{l}$  d'amorces oligo-dT (100 ng/ $\mu\text{l}$ ), (2) la synthèse du second brin d'ADNc par une ADN

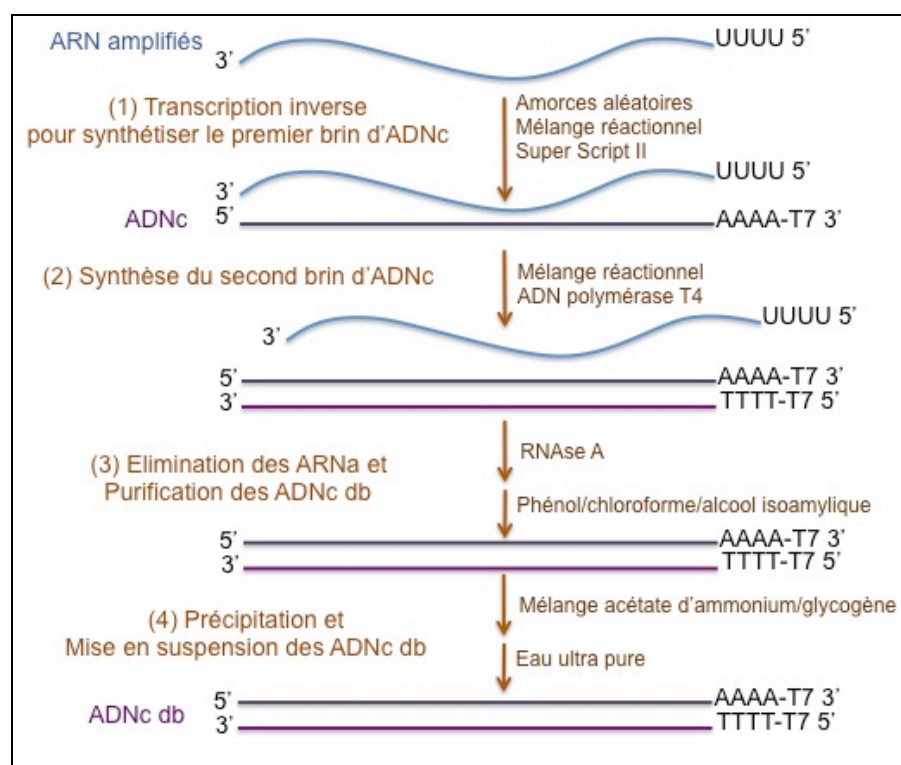
polymérase, (3) une purification des ADNc, (4) une transcription *in vitro* sur 14h et (5) une purification des ARN amplifiés (ARNa) sur colonne. Cette étape de transcription *in vitro* a été nécessaire afin de disposer, par la suite, de quantité optimale d'ADNc (2,5  $\mu\text{g}$  par échantillon, concentration  $\geq 100 \text{ ng}/\mu\text{l}$ ) pour l'étape d'hybridation sur puce.



**Figure 26. Résumé des étapes de synthèse et de purification des ARN amplifiés.**

A partir des ARNa ainsi synthétisés, l'ADNc double brin est préparé en utilisant le kit « SuperScript® Double-Stranded cDNA Synthesis » (Invitrogen, Paisley, Royaume-Uni) comme recommandé par NimbleGen dans le manuel « *NimbleChip™ Arrays User's Guide for gene expression analysis* ». Les échantillons sont traités en suivant les quatre étapes proposées par le fabricant (Figure 27) : (1) synthèse du premier brin d'ADNc à partir de 10  $\mu\text{g}$  d'ARNa en utilisant des amorces aléatoires et l'enzyme « SuperScript® II RT », (2) synthèse du second brin d'ADNc par l'ADN polymérase T4, (3) élimination des ARNa par un traitement à la RNase A et purification des ADNc grâce à un traitement au phénol/chloroforme/alcool isoamylique (25:24:1 v/v/v) suivi d'une centrifugation en « Phase Lock Gel™ Light 1,5 ml » (Fisher Scientific, Elancourt, France) facilitant la séparation des phases aqueuse et organique

et, (4) précipitation des ADNc db dans un mélange acétate d'ammonium/glycogène.



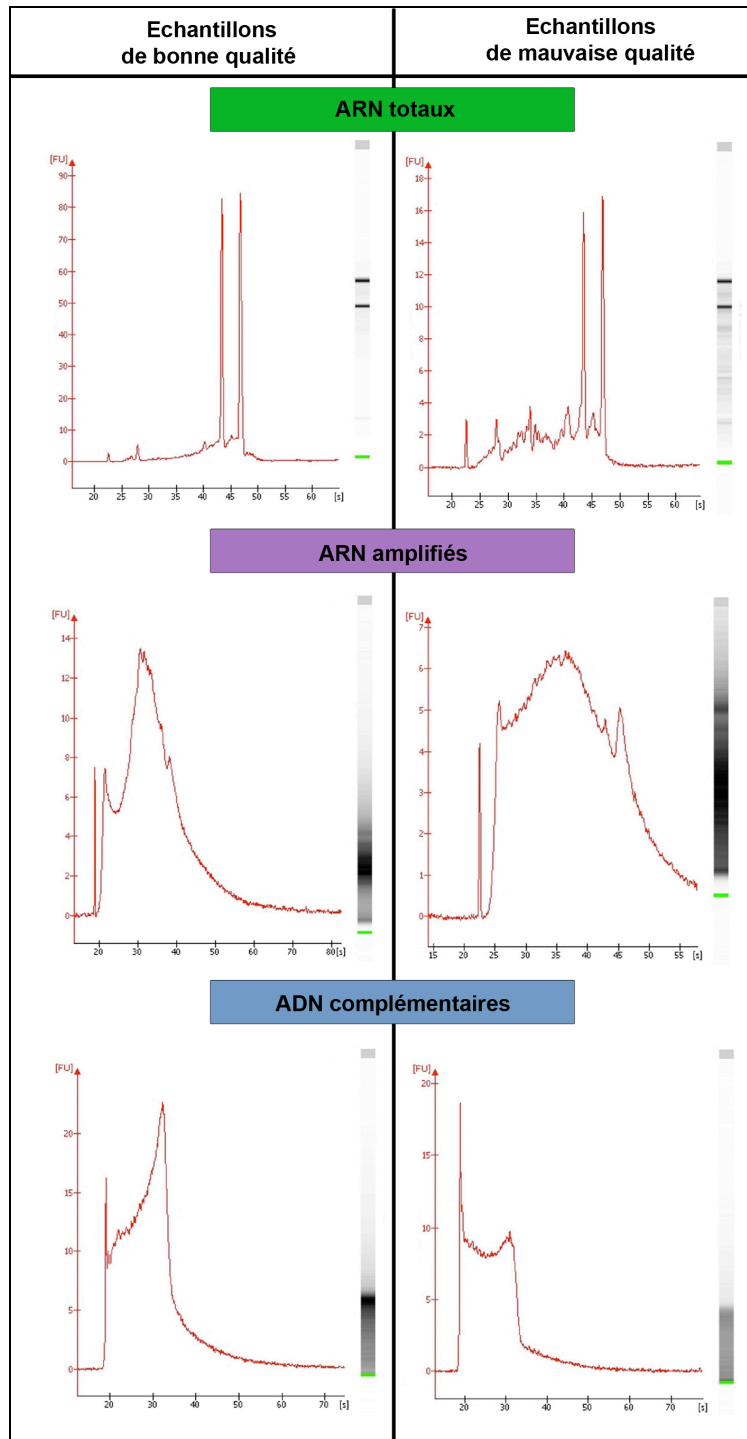
**Figure 27. Résumé des étapes de synthèse des ADNc double brin utilisés pour la préparation des cibles fluorescentes à hybrider sur la puce à ADN.**

### 3.3.3 Contrôle de qualité des acides nucléiques

Dans un premier temps, la concentration et la pureté des acides nucléiques sont mesurées à l'aide d'un spectrophotomètre NanoDrop® ND-1000 (NanoDrop Technologies, Wilmington, DE, USA). Ainsi, trois mesures de densité optique (DO) sont effectuées à différentes longueurs d'onde : 230, 260 et 280 nm, permettant de calculer les rapports de DO 260/280 et 260/230. Des rapports inférieurs à 1,8 signifient respectivement une contamination de l'échantillon par des protéines, ou une contamination par des hydrates de carbones, des peptides, du phénol, de l'urée ou des composés aromatiques. Ainsi, seuls des échantillons ayant des ratios strictement supérieurs à 1,8 sont retenus pour nos expériences.

Cette vérification de la pureté des échantillons est réalisée à chacune des étapes clés de la production des ADNc double brin: extraction des ARN totaux, amplification sélective des ARNm eucaryotes et enfin production des ADN complémentaires double brin.

Dans un deuxième temps, l'intégrité des acides nucléiques des échantillons retenus à la suite de l'analyse spectrophotométrique est également analysée. Ce contrôle de qualité est effectué par électrophorèse capillaire en utilisant un appareil Bioanalyzer 2100 (Agilent Technologies, Massy, France). Parmi les différents protocoles proposés par le fabricant, nous avons choisi le kit « Agilent RNA 6000 nano » permettant l'analyse des ARN totaux et des ARN messagers sur 1  $\mu$ l d'échantillon pour une gamme de concentrations de 25 à 500 ng/ $\mu$ l et 25 à 250 ng/ $\mu$ l respectivement. Ce kit est tout particulièrement adapté à nos échantillons car il permet de visualiser les acides nucléiques sur un large éventail de poids moléculaires, chaque poids moléculaire étant relativement peu concentré par rapport à la concentration totale de l'échantillon. Lors de la réalisation d'une analyse par électrophorèse capillaire, les acides nucléiques sont marqués par fluorescence et les profils obtenus pour les ARN totaux, ARNa et ADNc sont représentés dans la Figure 28. Les échantillons dégradés ont des intensités de fluorescence significativement inférieures et des profils beaucoup plus bruités et décalés vers les poids moléculaires les plus bas par comparaison aux échantillons de bonne qualité. A chaque étape clé, seuls ces derniers sont utilisés dans les étapes successives de production des ADNc.



**Figure 28. Exemples de profils obtenus lors de l'analyse qualité des échantillons utilisés dans cette étude par électrophorèse capillaire.**

Les profils présentés sont issus d'analyses de qualité réalisées sur des ARN totaux, des ARN amplifiés et des ADNc produits, en utilisant un appareil Bioanalyzer 2100 d'Agilent. A gauche, des exemples de profils d'échantillons de bonne qualité. A droite, des exemples de profils de mauvaise qualité : échantillons dégradés (ARN totaux et ARNa) ou faiblement concentré (ADNc).



---

### 3.4 Acquisition et traitement des données de puces à ADN

Après production des ADNc double brin, les échantillons sont fournis à NimbleGen pour la réalisation des étapes d'hybridation et acquisition des données.

Dans une première étape, les échantillons d'ADNc sont marqués en utilisant des amorces 9-mer marquées à la cyanine Cy3 (marqueur fluorescent dans le vert, excitation à 550 nm et émission à 570 nm) (Chapitre 3 du guide NimbleGen « NimbleChip™ Arrays user's guide, gene expression analysis »). Cette réaction de marquage est réalisée en présence d'un mélange réactionnel incluant, entre autres, des dNTP et le fragment de Klenow (ayant une activité polymérase 5' → 3' et une activité exonucléase 3' → 5') de l'ADN Polymérase de type I d'*Escherichia coli*. Après purification, les ADNc marqués sont remis en suspension dans 25 µl d'eau. Leur concentration est enfin mesurée afin de réaliser des aliquotes de 4 µg d'ADNc par tube.

L'étape suivante consiste en l'hybridation des ADNc marqués sur les lames et leur lavage (cf. chapitre 4 du guide NimbleGen précédemment cité). Les ADNc marqués sont remis en suspension dans 3,3 µl d'un « Sample Tracking Control » spécifique permettant leur identification dans chacune des quatre sections de la puce et déposés sur les lames selon le plan expérimental choisi. Nous avons choisi de répartir de manière aléatoire nos 12 échantillons (trois réplicats biologiques pour chacun des 4 stades embryonnaires utilisés dans ce travail) sur l'ensemble des lames utilisées afin de ne pas confondre un éventuel effet lame avec l'une de nos conditions testées. Après 16 à 20 h d'incubation à 42°C, les lames sont finalement lavées dans trois bains de stringence différente sous agitation constante et séchées par centrifugation. La stratégie de marquage choisie pour ces puces est monochrome : l'intensité de la fluorescence associée à chaque sonde après hybridation correspond à une seule condition expérimentale (en opposition avec les puces bichromatiques qui comparent deux situations expérimentales en même temps avec une couleur spécifique attribuée à chaque modalité).

Aussitôt après lavage et séchage, la lecture des lames est réalisée à l'aide d'un scanner GenePix 4000B et de ses logiciels associés (cf. chapitre 5 du guide NimbleGen précédemment cité).

Les images sont ensuite importées et les données sont extraites en utilisant le logiciel «NimbleScan ». Pour chaque fichier image, un fichier « .pair », qui contient les intensités brutes de toutes les sondes associées à

chaque gène de la puce, est créé (cf. chapitre 6 du guide NimbleGen précédemment cité).

Avant d'effectuer l'analyse statistique des données, une normalisation est nécessaire. Cette normalisation permet de retrancher le bruit de fond et également de calibrer les distributions des niveaux de fluorescence de chaque expérience (les différentes sections sur les différentes lames). La méthode choisie par NimbleGen pour normaliser nos données est la méthode RMA (Robust Multiarray Average) (Irizarry, *et al.*, 2003). Cette méthode, basée sur l'ajustement moyen des quantiles des distributions de fluorescences (toutes les réactions sont ramenées à une même moyenne et une même variance) est très efficace d'une part pour détecter les faibles valeurs d'intensité de signal (grâce à l'élimination du bruit de fond) et d'autre part pour éliminer les variations d'hybridation entre les sections de chaque lame (Bolstad, *et al.*, 2003 ; Irizarry, *et al.*, 2003).

Après normalisation, les valeurs d'intensité d'expression associées à chaque gène sur la puce « ACYPI v1.0 » sont comprises entre 80 et un peu plus de 63 000 (encodage sur 16 bites de chaque pixel de l'image TIFF). Ces données sont transformées en  $\log_2$  et les nouvelles valeurs d'intensité comprises entre 2 et 16, ce qui est couramment observé pour des puces à ADN NimbleGen (cf. annexe A étape 3 du guide NimbleGen précédemment cité). Cette transformation, qui est classiquement appliquée aux données de puces à ADN, permet de s'approcher d'un cadre gaussien.

---

### 3.5 Analyse statistique des données de puce à ADN

Afin de révéler les différences d'expression des gènes entre les 4 stades de développement étudiés dans notre travail, nous procédons à une analyse de variance (ANOVA). Trois comparaisons sont réalisées afin de suivre l'évolution de l'expression des gènes tout au long du développement du puceron : EE vs IE, IE vs LE et LE vs L1.

Notre jeu de données comportant 3 répétitions pour chacun des 4 stades, une analyse ANOVA à 1 facteur (avec 4 modalités) est réalisée sur les données normalisées. Le principe de l'ANOVA appliquée est de comparer une variance intergroupe (entre stades de développement) à une variance intragroupe (entre les 3 réplicats par groupe), en ajustant le modèle suivant :

$$Y_{gik} = \mu_g + S_{gi} + \epsilon_{gik}$$

avec  $\mu_g$  = effet constant du gène  $g$ ,  $S_{gi}$  = effet différentiel du stade  $i$  ( $i = 1$  à  $4$ ) pour le gène  $g$ ,  $\epsilon_{gik}$  = erreur aléatoire pour chacune des  $k$  répétitions ( $k = 1$  à  $3$ ). Ici, l'effet lame n'est pas présent car on le considère nul grâce à la

normalisation RMA. Le test global de l'ANOVA n'est pas utilisé ici, nous nous sommes focalisés sur trois contrastes en particulier : EE-IE, IE-LE et LE-L1. Ainsi, pour chacune de ces 3 comparaisons les hypothèses nulles ( $S_{gEE} - S_{gIE} = 0$  ;  $S_{gIE} - S_{gLE} = 0$  et  $S_{gLE} - S_{gL1} = 0$ ) ont été testées.

Pour déterminer les gènes différentiellement exprimés entre deux modalités, la variance intragroupe pour chacun des gènes est estimée selon la méthode de réduction de la variance, proposée par Smyth et collaborateurs (2004). Les niveaux d'expression des 24 011 transcrits analysés avec notre puce à ADN n'étant ni totalement indépendants (e.g. des groupes de gènes sont co-régulés) ni totalement dépendants, cette méthode, basée sur une approche bayésienne, permet d'ajuster la variance de l'intensité d'expression de chaque gène en fonction de la variance globale (de l'ensemble des gènes). Ainsi la variance de chaque gène reste spécifique tout en étant pondérée avec l'ensemble des gènes. En d'autres termes, si pour ces trois répliquats, un gène montre une variance très moyenne, la variance intragroupe estimée sera très proche de la variance moyenne de l'ensemble des gènes et la méthode de réduction de variance n'influence quasiment pas l'estimation de la variance intergroupe. A l'inverse, si un gène montre une variance très faible (ou très forte) de ses répliquats, alors la pondération par la variance moyenne augmente (ou diminue) l'estimation de la variance intragroupe, limitant ainsi le nombre de faux positif (ou de faux négatif) à l'étape du test.

De plus, la transformation en log2 des données normalisées ne permet que partiellement d'obtenir des distributions de signal gaussiennes. Or, pour réaliser nos analyses ANOVA et pour définir les p-valeurs pour chaque test, il est nécessaire que la variable  $Y_{gik}$  suive une loi normale. Afin d'estimer des p-valeurs sans l'hypothèse de normalité, nous avons réalisé un ré-échantillonnage de nos lames, c'est-à-dire mettre aléatoirement chaque lame dans un groupe (EE, IE, LE, L1), de façon à pouvoir simuler les tests sous l'hypothèse  $H_0$  (pas d'effet différentiel). Mille simulations sont réalisées pour chaque test et la distribution de la statistique de t est estimée sous  $H_0$ , permettant ainsi de déterminer une p-valeur pour chaque gène et pour les 4 conditions testées que nous avons réparties.

Enfin, pour générer les listes de gènes différentiels, nous sommes amenés à réaliser 24 011 analyses ANOVA. Si l'on considère, sous l'hypothèse  $H_0$  (pas d'effet différentiel) un seuil de rejet à tort de 5%, on obtiendra 1000 faux positifs (gènes désignés comme variant significativement alors qu'ils ne le sont pas). Il est donc nécessaire d'ajuster les p-valeurs afin d'intégrer ce problème des tests multiples grâce à la méthode proposée par Benjamini et Hochberg (1995) appliquée aux

données de puces à ADN par Dudoit et collaborateurs (2003). Cette méthode permet de limiter le nombre de faux positifs par un contrôle du FDR (False Discovery Rate). Nous avons fixé un seuil de 5 % de faux positifs dans l'ensemble de nos analyses.

Enfin, nous avons appliqué un dernier filtre sur nos données en ne retenant que les gènes dont les variations étaient biologiquement fortes. Ainsi au final, un gène est considéré comme variant significativement d'expression s'il remplit les deux critères suivants : (i) la p-valeur après ajustement est inférieure au risque de 1<sup>ère</sup> espèce (en l'occurrence toujours choisie à 5%), (ii) la différence d'intensité d'expression (en log2) est supérieure ou égale à 1 dans la comparaison considérée.

---

### **3.6 Validation des données de puce par RT-PCR en temps réel**

---

#### 3.6.1 Validation de la qualité des échantillons

Afin de confirmer les résultats obtenus par l'approche transcriptomique effectuée avec des ARN amplifiés, des expériences de RT-PCR en temps réel sont réalisées sur de nouveaux échantillons biologiques indépendants et dont les ARN extraits ne sont pas amplifiés. Comme pour les expériences de puces à ADN, les quatre mêmes groupes de développement sont analysés : EE (400  $\mu$ m), IE (400-800  $\mu$ m), LE (> 800  $\mu$ m) et L1 (0-24 h). Pour chacun des groupes, trois répétitions biologiques sont réalisées.

##### *3.6.1.1 Extraction des ARN totaux*

Comme pour les expériences de puces à ADN, les ARN totaux sont isolés à l'aide du kit « RNeasy Mini » (Qiagen), en utilisant le protocole « Animal tissues » (cf Matériel et Méthodes §3.3.1 p 101). Toutes les étapes de purification sont communes, à l'exception d'une étape de traitement à la DNase (RNase-Free DNase Set, Quiagen) qui est réalisée après l'étape de purification avec le tampon RW1 (350  $\mu$ l au lieu de 700  $\mu$ l). Ainsi, 80  $\mu$ l de mix DNase (10  $\mu$ l de DNase et 70  $\mu$ l de tampon RDD fourni avec la DNase) sont ajoutés directement sur la membrane de la colonne et une incubation de 15 min à température ambiante est effectuée. Après une nouvelle étape de purification avec le tampon RW1 (350  $\mu$ l), l'extraction se poursuit ensuite comme précédemment décrit (cf Matériel et Méthodes §3.3.1 p 101). Cette étape supplémentaire permet ainsi d'éliminer tout risque de contamination des échantillons par de l'ADN génomique (ADNg) qui pourrait être amplifié lors de la PCR en temps réel. Ce traitement n'a

pas été réalisé pour les expériences de puces à ADN en raison de la sélectivité de l'étape d'amplification qui permet de cibler de façon spécifique les ARN messagers.

### 3.6.1.2 Préparation des ADNc

Dans le cadre des expériences de RT-PCR quantitative, une réaction de transcription inverse est tout d'abord réalisée à partir de 1  $\mu$ g d'ARN totaux dans un volume final de 21  $\mu$ l en suivant le protocole du kit « SuperScript™ First-Strand Synthesis System for RT-PCR » (Invitrogen). Pour cela, 1  $\mu$ l d'amorces aléatoires et 1  $\mu$ l de dNTP sont ajoutés à 1  $\mu$ g d'ARN, avant de compléter l'échantillon par de l'eau ultra pure stérile pour obtenir un volume de 10  $\mu$ l. L'échantillon est ensuite incubé 5 min à 65°C (dénaturation des structures secondaires des ARN et début d'hybridation des amorces) puis refroidi 1 min à 4°C. 9  $\mu$ l de mélange réactionnel, composé de 2  $\mu$ l de tampon concentré 10x, 4  $\mu$ l de MgCl<sub>2</sub> 25 mM, 2  $\mu$ l de DTT 0,1 M et 1  $\mu$ l d'enzyme RNase Out sont alors ajoutés à l'échantillon. Le mélange ainsi obtenu est incubé 2 min à 25°C avant l'ajout de 1  $\mu$ l d'enzyme SuperScript™ III. Une série d'incubations est alors réalisée : 10 min à 25°C (hybridation des amorces), 50 min à 42°C (synthèse des ADNc), 15 min à 70°C (fin de réaction de synthèse) et enfin, au moins 2 min à 4°C (conservation des produits de RT). L'ajout de 1  $\mu$ l de RNase H associé à une incubation de 20 min à 37°C permet finalement de dégrader l'ARN présent initialement dans le mélange réactionnel.

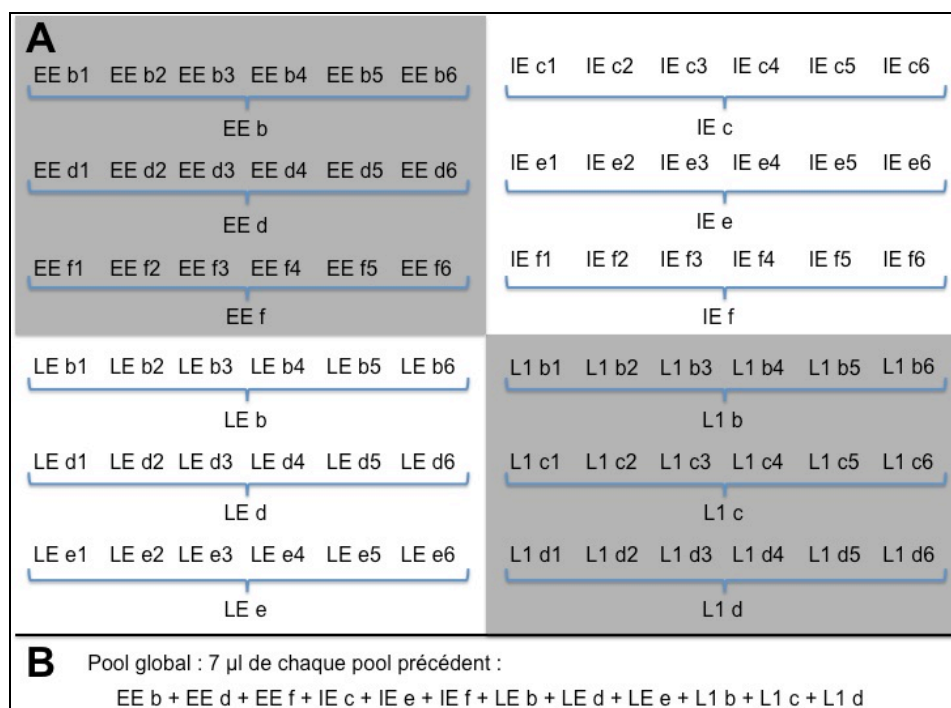
### 3.6.1.3 Validation de la qualité des échantillons

Pour chacun des échantillons, six réactions de RT sont réalisées afin de disposer de suffisamment de matériel pour l'ensemble des réactions de qRT-PCR prévues. Un contrôle négatif de rétrotranscription (où l'enzyme SuperScript™ III n'a pas été ajoutée) est également réalisé pour chaque échantillon. Ce contrôle permet de vérifier l'éventuelle présence de contamination par de l'ADN génomique.

Pour contrôler la qualité de chaque produit de RT, des PCR utilisant des amorces spécifiques de deux gènes de normalisation (ACYPI000064 : *actine* et ACYPI000074 : *rpl32*) sont effectuées. La qualité est ensuite vérifiée par électrophorèse sur gel d'agarose 1,5% dans un tampon TAE (Tris-acétate 2M, EDTA 0,05 mM, pH = 8,3) (Sigma-Aldrich, St Quentin Fallavier, France). Une bonne qualité des produits obtenus se traduit par l'absence d'amplification dans les puits contenant les produits de PCR issus des contrôles négatifs (absence d'ADNg contaminant) et par la forte et spécifique amplification du fragment du gène de normalisation ciblé.

Après validation de la qualité de chacun des échantillons, les 6 produits de RT sont rassemblés afin de travailler sur un seul et même échantillon par répétition, et de limiter les biais expérimentaux (Figure 29). Ces 12 pools d'ADNc sont utilisés pour doser les transcrits de chacun des groupes de stade à partir des trois répétitions par stades. En prélevant 7  $\mu$ l de chacun de ces 12 pools d'ADNc et en les mélangeant, on réalise une solution stock d'ADNc qui est représentatives de l'ensembles des conditions expérimentales analysées et qui nous sert de matrice pour la réalisation des gammes étalons de chacun des gènes à tester (cf. Matériel et Méthodes §3.6.3.1 p 114).

Après homogénéisation au vortex, tous ces pools d'ADNc sont partagés en plusieurs aliquotes afin que les échantillons ne subissent pas plusieurs cycles de congélation/décongélation à chaque réalisation d'un RT-PCR quantitative. Juste avant l'étape de réalisation de la PCR en temps réel, le volume nécessaire de produits de RT pour 3 réplicats (cf. §3.6.3 ci-après), est dilué au 1/5ème avec de l'eau ultra pure autoclavée.



**Figure 29. Récapitulatif des produits de transcription inverse et des pools réalisés pour la réalisation des expériences de RT-PCR en temps réel.**

**A)** Les échantillons sont constitués des 4 stades de développement étudiés (EE, IE, LE, L1), à raison de 3 répétitions biologiques par échantillon (ex : EE b, EE d, EE f). Les 3 échantillons ont été préalablement sélectionnés sur la qualité des ARNm, à partir de 6 répétitions biologiques labellisées par une lettre de a et f. Pour chaque échantillon retenu, 6 transcriptions inverses ont été réalisées et sont labellisées par un chiffre allant de 1 à 6. Après vérification de la qualité des ADNc, les répétitions de chaque échantillon sont rassemblées.

**B)** Un pool global de tous les échantillons de tous les stades a été réalisé à partir de 7  $\mu$ l de chaque pool décrit en A). Ce pool a été utilisé pour la réalisation des gammes étalon.

### 3.6.2 Choix du gène de normalisation, choix des amorces

#### 3.6.2.1 Choix du gène de normalisation

Une difficulté majeure rencontrée lors d'expériences de RT-PCR quantitative est le choix du gène de normalisation. En effet, il est impossible de savoir *a priori* qu'un gène aura un niveau d'expression invariant pour l'ensemble des conditions expérimentales que nous désirons tester. La littérature a montré que les gènes de ménage, définis à l'origine comme ayant des niveaux d'expression universellement invariants, peuvent voir leur expression significativement varier dans certaines conditions physiologiques (Andersen, *et al.*, 2004 ; Manganelli, *et al.*, 1999). Or, la normalisation des données d'expression par un gène invariant est une étape

indispensable afin de pouvoir s'affranchir de biais propres aux étapes de préparation des échantillons ou encore spécifiques à certaines conditions expérimentales testées. C'est pourquoi, nous avons choisi initialement deux gènes de normalisation : ACYPI000074 et ACYPI000064 codant respectivement pour la protéine L32 de la sous-unité ribosomale 60S et l'actine constituant les microfilaments du cytosquelette cellulaire. Notre choix s'est porté sur ces gènes pour plusieurs raisons : (i) lors d'expériences d'analyse de l'expression de gènes menées sur *A. pisum* dans notre unité, ces gènes n'ont révélé aucune expression différentielle pour les différentes conditions testées, (ii) ces gènes présentaient des expressions de même ordre de grandeur que nos gènes testés, (iii) enfin, ces gènes ne sont pas directement liés aux voies de régulation des gènes d'intérêts dans cette étude.

Afin de s'assurer que ces deux gènes sont bien invariants dans notre jeu de données, nous avons mesuré leurs niveaux d'expression dans les 4 groupes de développement analysés dans cette étude par des expériences préliminaires de RT-PCR quantitative. Les données ainsi obtenues ont été testées grâce au logiciel "BestKeeper" développé par Pfaffl et collaborateurs (2004). En testant la variation du niveau d'expression d'un gène entre deux ou plusieurs conditions expérimentales, cet outil permet de valider l'utilisation du gène en question comme témoin de normalisation dans des conditions données.

#### 3.6.2.2 Choix des amorces

En plus des deux gènes de normalisation, les niveaux d'expression de 8 gènes mis en évidence par l'analyse par puces à ADN (ACYPI009127, ACYPI001858, ACYPI007803, ACYPI004721, ACYPI004243, ACYPI009481, ACYPI009491, ACYPI8168) sont testés par RT-PCR en temps réel. Les amorces spécifiques à l'amplification de ces gènes (Tableau 3), avec une taille comprise entre 16 et 21 nucléotides, sont sélectionnées à l'aide du logiciel "OLIGO 7" (OLIGO Primer Analysis Software version 7, Molecular Biology Insights Inc. Cascade, CO, USA), <http://www.oligo.net/> (Rychlik, 2007). Les sondes relatives aux gènes ACYPI009127 and ACYPI001858, sont issues de la publication de Brisson et collaborateurs (2010)



**Tableau 3. Amorces oligonucléotidiques utilisées pour la réalisation des expériences de RT-PCR en temps réel.**

Gène	Amorces	Séquences	Taille de l'amplicon (bp)
ACYPI009127-RA	Forward (F) Reverse (R)	5'-CGA-TCA-AGT-ACT-ACG-GAA-TGG-AG-3' 5'-ATT-CTG-AGA-ACA-GGT-TTC-GAT-AGG-3'	95
ACYPI001858-RA	Forward (F) Reverse (R)	5'-GCC-ATT-GCA-GGT-CAG-TCT-CT-3' 5'-GCG-AGT-CAG-GTA-GTG-GTT-GG-3'	119
ACYPI007803-RA	Forward (F) Reverse (R)	5'-TTC-ACG-ACA-AAA-AAC-ATT-CTT-TC-3' 5'-AAA-TTA-AAC-GCA-GTA-ACG-AAC-3'	124
ACYPI004721-RA	Forward (F) Reverse (R)	5'-CTG-TAT-AAG-ATC-ATT-AAA-CCC-3' 5'-AAT-AAA-ACA-TCC-AAC-GC-3'	188
ACYPI004243-RA	Forward (F) Reverse (R)	5'-AAT-AGG-TAT-TAA-AAT-AGA-CTG-3' 5'-AAT-AGG-TAT-TAA-AAT-AGA-CTG-3'	193
ACYPI009481-RA	Forward (F) Reverse (R)	5'-GTC-GGC-GGT-GGT-AAT-C-3' 5'-CCT-GTC-GCA-GTA-GTT-AGG-TGA-3'	168
ACYPI009491-RA	Forward (F) Reverse (R)	5'-CCA-AGA-TGA-GTT-CGG-TCA-GTA-3' 5'-GTA-GTG-TTG-GGT-CTG-TCC-GT-3'	133
ACYPI008168-RA	Forward (F) Reverse (R)	5'-AAG-GGC-TAC-TCT-GGT-ATT-GC-3' 5'-GTC-TTC-GGC-TAG-AAT-CGT-AAT-3'	238
ACYPI000074-RA	Forward (F) Reverse (R)	5'-AGT-ATC-GCC-CAA-CAA-TTA-TCA-3' 5'-CTT-GAA-TCG-TCT-TCG-GAC-T-3'	130
ACYPI000064-RA	Forward (F) Reverse (R)	5'-AAGTTATCACAATCGGAAATG-3' 5'-GGCAATACCAGGGTACAT-3'	196

### 3.6.3 Réalisation des expériences de RT-PCR en temps réel

#### 3.6.3.1 Préparation de la gamme étalon

Pour les expériences de PCR en temps réel, la réalisation d'une gamme d'étalonnage spécifique à chacun des gènes est nécessaire. Celle-ci permet de définir le niveau d'expression des gènes. De plus, la quantification d'un transcrit d'intérêt est réalisée relativement à un gène de référence et la gamme étalon permet d'obtenir l'efficacité de PCR pour chacun des gènes à tester, critère indispensable pour pouvoir comparer les uns par rapport aux autres leurs niveaux d'expression respectifs.

Chacune des gammes étalon est réalisée à partir de produits de PCR spécifiques à chaque gène. Ces produits sont obtenus par amplification d'1  $\mu$ g d'une solution d'ADNc représentative des 4 groupes expérimentaux utilisés dans notre étude (cf Matériel et Méthodes §3.6.1.3 p 110), en utilisant l'ADN polymérase "UptiTherm" (Interchim, Montluçon, France) et selon les conditions expérimentales présentées dans la Figure 30.

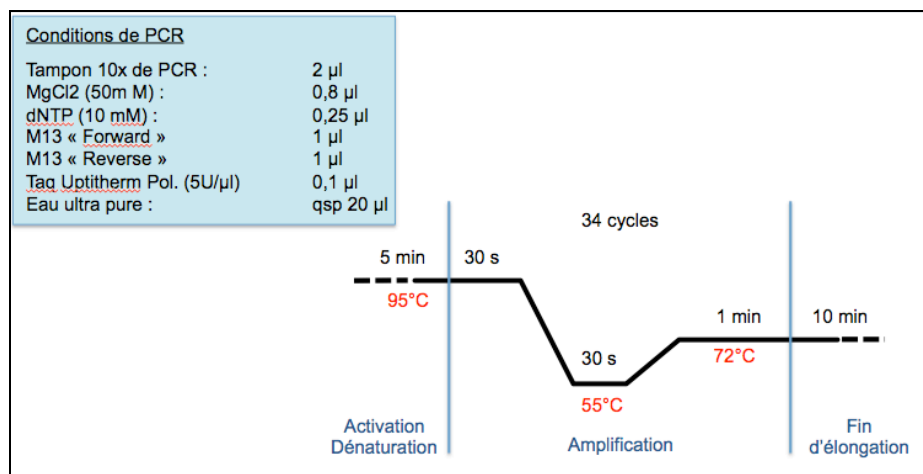


Figure 30. Résumé des conditions de réalisation des réactions de PCR.

Les produits de PCR sont ensuite purifiés par passage sur les colonnes fournies par le kit « GenElute™ PCR clean up » (Sigma) puis élués dans 50  $\mu$ l d'eau ultra pure. Leur concentration ainsi que leur degré de pureté sont déterminés au spectrophotomètre (NanoDrop® ND-1000). Les produits de PCR sont finalement vérifiés sur gel d'agarose 1,5 % dans un tampon TAE afin de s'assurer de la spécificité d'amplification. Les concentrations des produits de PCR sont toutes ajustées à 10 ou 20 ng/ $\mu$ l (selon les concentrations obtenues après purification) avec de l'eau ultra pure. Les solutions mères des gammes étant conservées à -20°C, la gamme étalon relative au gène à tester en RT-PCR en temps réel est préparée extemporanément. Pour cela, 10 dilutions au 1/10ème sont réalisées en cascade dans de l'eau ultra pure. Pour nos expériences, seules les 8 dernières dilutions sont retenues, de façon à obtenir une gamme étalon variant de 2000 fg/ $\mu$ l à 0,0002 fg/ $\mu$ l.

### 3.6.3.2 Plan expérimental

Les niveaux d'expression des gènes d'intérêt sont mesurés dans les 4 groupes de développement utilisés dans cette étude (EE, IE, LE, L1) à raison de 3 répétitions biologiques par groupe. Pour chaque répétition, 3 réplicats sont effectués (Figure 31).

Les réactions de RT-PCR sont réalisées sur des plaques 96 puits, chacune comportant un gène de normalisation et un gène à tester, ainsi que la gamme étalon propre à chacun des deux gènes (Figure 31).

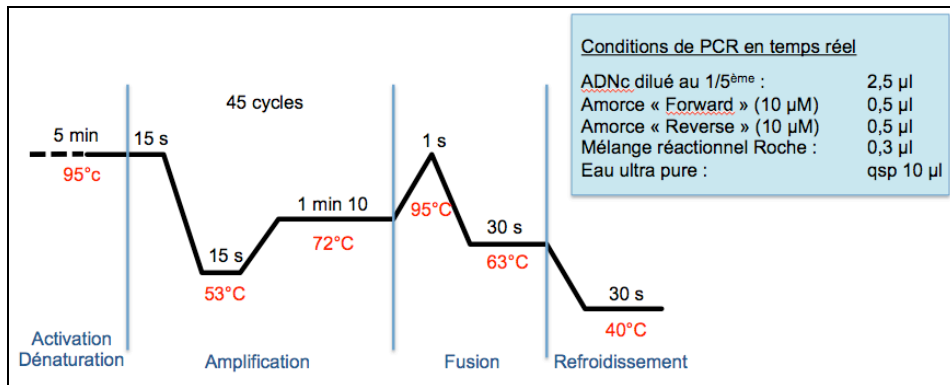
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	Blanc	D1	D2	D3	D4	D5	D6	D7	D8			
B	EE b	EE d	EE f	IE c	IE e	IE f	LE b	LE d	LE e	L1 a	L1 b	L1 f
C	EE b	EE d	EE f	IE c	IE e	IE f	LE b	LE d	LE e	L1 a	L1 b	L1 f
D	EE b	EE d	EE f	IE c	IE e	IE f	LE b	LE d	LE e	L1 a	L1 b	L1 f
E	Blanc	D1	D2	D3	D4	D5	D6	D7	D8			
F	EE b	EE d	EE f	IE c	IE e	IE f	LE b	LE d	LE e	L1 a	L1 b	L1 f
G	EE b	EE d	EE f	IE c	IE e	IE f	LE b	LE d	LE e	L1 a	L1 b	L1 f
H	EE b	EE d	EE f	IE c	IE e	IE f	LE b	LE d	LE e	L1 a	L1 b	L1 f

**Figure 31. Organisation de la plaque 96 puits utilisée pour la réalisation des expériences de RT-PCR en temps réel.**

Les puits des quatre premières lignes (A à D) correspondent au gène de normalisation ACYPI000064 (actine), et ceux des quatre dernières lignes (E à H) correspondent au gène testé. Pour chaque gène, un témoin négatif (« Blanc ») est réalisé avec de l'eau. De même, une gamme étalon à 8 points (D1 à D8) est effectuée pour chaque gène de la plaque à partir de produits de PCR. L'expression d'un gène testé est quantifiée pour les 4 groupes de stades (4 couleurs) dans une seule et même plaque. Chaque stade est représenté par 3 répétitions biologiques illustrées par les 3 intensités de couleur. Chaque échantillon est déposé trois fois.

### 3.6.3.3 Réaction de PCR en temps réel et quantification

Les réactions de PCR en temps réel sont réalisées dans un thermocycleur "Light Cycler" 96 puits LC 480 (Roche). Le protocole se compose de 4 étapes : une étape de dénaturation des échantillons (5 min à 95°C) servant également à l'activation de l'ADN polymérase, une étape d'amplification de 45 cycles (15 s à 95°C, 15 s à 53°C et 1 min 10 s à 72°C), une étape de fusion permettant de vérifier la spécificité de la réaction de PCR (1 s à 95°C puis 30 s à 63°C), et une étape de refroidissement (30 s à 40°C) (Figure 32). Pour l'ensemble des expérimentations, le cycle seuil (Ct) a été déterminé par la méthode du calcul de la valeur maximale de la dérivée seconde de la courbe  $RFU=f(n)$ , RFU étant la valeur mesurée relative aux variations du signal de fluorescence émis d'un cycle à un autre, et n le nombre de cycles.



**Figure 32. Résumé des conditions de réalisation des réactions de RT-PCR en temps réel.**

### 3.6.4 Normalisation et analyse statistique des données

Les données sont normalisées et analysées selon la méthode comparative des Ct ("threshold cycle"), qui correspondent aux nombres fractionnaires de cycles pour lequel l'intensité de la fluorescence émise a dépassé une valeur seuil significativement différente du bruit de fond (Tse, *et al.*, 2003). Cette méthode de quantification relative consiste, après co-amplification du gène cible avec un gène de référence, à comparer les Ct calculés à partir de l'échantillon de la condition "test" et de l'échantillon de la condition "contrôle". Le nombre de transcrits initialement présents pour la condition "test", normalisé par rapport au gène de référence et relatif à la condition contrôle est donné par la formule "2- $\Delta\Delta Ct$ " où :  $\Delta\Delta Ct = \Delta Ct$  (condition test) -  $\Delta Ct$  (condition contrôle) avec  $\Delta Ct = Ct$  (gène cible) -  $Ct$  (gène référence). Cependant, comme pour de nombreuses méthodes de quantification, la méthode du  $\Delta\Delta Ct$  repose sur l'hypothèse que les efficacités d'amplification de PCR des gènes cibles et de référence sont identiques. Or, ceci n'est pas complètement vérifié, à cause, en partie, des propriétés structurales de chaque amplicon. C'est pourquoi, dans le cadre de ces expérimentations, nous avons utilisé le modèle mathématique développé par Pfaffl et collaborateurs (2001) qui permet de corriger les différences d'efficacité d'amplification entre les différents gènes. Dans ce modèle, le ratio d'expression d'un gène cible entre deux conditions expérimentales, normalisé par rapport à un gène de référence, est calculé selon l'équation suivante :

$$Ratio = \frac{(E_{\text{gène cible}})^{\Delta Ct_{\text{gène cible}}(\text{contrôle-test})}}{(E_{\text{gène référence}})^{\Delta Ct_{\text{gène référence}}(\text{contrôle-test})}}$$

où  $E$  représente l'efficacité d'amplification,  $C_t$  le cycle seuil, et  $\Delta$  la différence de  $C_t$  entre les deux conditions à tester. Afin de faciliter l'utilisation de ce modèle mathématique, Pfaffl et collaborateurs ont développé en 2002 le logiciel REST<sup>®</sup> (Relative Expression Software Tool), qui permet d'obtenir le ratio présenté ci-dessus (Pfaffl, *et al.*, 2002) (<http://www.wzw.tum.de/gene-quantification>). Un autre avantage de cet outil est la possibilité d'utiliser plusieurs gènes de normalisation et de comparer plusieurs conditions "tests" par rapport à une condition "contrôle" en parallèle.

## 4 Caractérisation fonctionnelle par l'approche d'ARN interférents

### 4.1 Production des ARN double brin (ARNdb)

### 4.2 Méthode d'administration des ARNdb

### 4.3 Suivi de mortalité et de fécondité

### 4.4 Suivi de l'expression du gène ACYPI007803

---

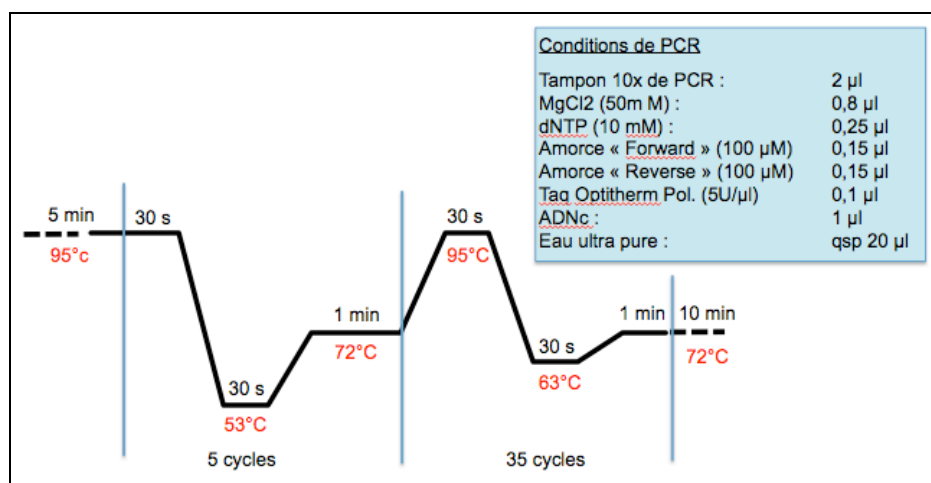
### 4.1 Production des ARN double brin (ARNdb)

---

#### 4.1.1 Production et purification des ADNdb

La synthèse d'ARN double brin est réalisée à partir d'ARN totaux extraits de pucerons entiers à l'aide du kit « RNeasy Mini » (Qiagen), comme précédemment décrit (cf. Matériel et Méthodes §3.3.1 p 101). Les ARN sont ensuite rétrotranscrits en ADNc selon le protocole du kit « SuperScript™ First-Strand Synthesis System for RT-PCR » (Invitrogen) (cf. Matériel et Méthodes §3.6.1.2 p 110) en utilisant des amorces oligo dT.

Les séquences cibles des gènes d'intérêt et de contrôle (respectivement ACYPI007803 et egfp) sont sélectionnées grâce au logiciel E-RNAi (<http://www.dkfz.de/signaling/e-rnai3//>) (Arziman, *et al.*, 2005). Le gène egfp n'est pas présent dans le génome du puceron, il sert de contrôle négatif. Une queue T7 (TAATACGACTCACTATAGGG) permettant la synthèse d'ARNdb dans des étapes ultérieures est ajoutée à l'extrémité 3' des amorces. En utilisant les amorces désignées avec le logiciel E-RNAi, les séquences cibles des deux gènes sont amplifiées par PCR à partir d'ADNc ou du plasmide pMP2444 (portant le gène egfp). Les conditions de PCR utilisées pour cette amplification sont présentées dans la Figure 33.



**Figure 33. Résumé des conditions de réalisation des réactions de PCR pour la production des ADN db utilisés pour les expériences d'ARN interférent.**

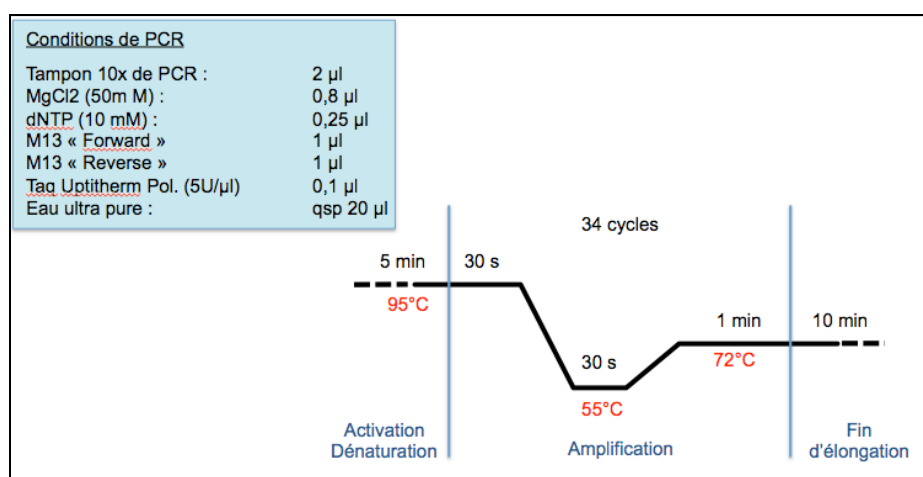
Les produits de PCR sont ensuite purifiés par précipitation au polyéthylène glycol (PEG) (20% PEG, 2,5 M NaCl). Un volume de PEG identique à celui de l'échantillon de produits de PCR est ajouté, puis ce mélange est incubé à 37°C pendant 15 min, permettant la précipitation des acides nucléiques. Après 15 min de centrifugation à 11 000 g, le surnageant est éliminé. Les culots sont lavés par deux centrifugations à l'éthanol 80% (2 min à 11 000 g). L'éthanol est finalement éliminé et les culots sont séchés 5 min à 50°C. Après mise en suspension des culots dans de l'eau (1 µl par µl de réaction de PCR), les ADNdb sont quantifiés au spectrophotomètre (NanoDrop® ND-1000) et leur qualité est vérifiée par électrophorèse sur gel d'agarose 1,5 %.

#### 4.1.2 Clonage des produits de PCR

Afin de disposer de quantités optimales d'ADN db, une étape de clonage est effectuée. L'ADNdb obtenu précédemment est introduit dans le plasmide pCR 2.1 TOPO (3,9 kb) (Invitrogen) grâce à la déoxy-adénosine synthétisée en 3' par la Taq polymérase lors de l'étape d'amplification. La ligation est réalisée avec le kit « TOPO® TA cloning » (Invitrogen). 1 à 4 µl de produits de PCR sont incubés 30 min à température ambiante avec 1 µl de vecteur TOPO et 1 µl de solution saline fournie dans le kit. Le volume final est ajusté à 6 µl avec de l'eau. Des bactéries *Escherichia coli* (TOP10F') sont transformées par insertion du plasmide. Elles sont mises en présence de 2 µl de solution de ligation et subissent un choc thermique (30 min dans la glace, suivi de 30 s à 42°C puis de nouveau dans la glace pendant 2 min). Après ajout de 250 µl du milieu de culture riche SOC, le mélange est placé sous agitation (200 rpm) à 37°C pendant une heure. 20 µl

de cette solution sont finalement étalés sur milieu LB complétement en gentamicine en boîte de Petri sur lesquelles sont précédemment déposés 40  $\mu$ l d'X-Gal (40 mg/ml) et 40  $\mu$ l d'IPTG (100 mM). Les bactéries sont ensuite incubées à 37°C pendant une nuit.

Seules les bactéries ayant été transformées par le plasmide PCR2.1 TOPO sont résistantes à la gentamicine et donc capables de se multiplier. Ce plasmide contient aussi le gène lacZa, qui permet aux bactéries, en présence d'IPTG de transformer le X-Gal en composé bleu, facilement repérable. L'insertion d'une séquence d'ADN au sein de ce gène lacZa l'empêche de fonctionner et engendre donc des colonies blanches, ou légèrement bleutées en leur centre. En conséquence, les colonies bleu foncé correspondent à celles qui n'ont pas inséré le gène d'intérêt. Afin de vérifier l'insertion de notre séquence cible dans le plasmide, une quinzaine de colonies blanches sont sélectionnées au hasard et repiquées sur de nouvelles boîtes de Petri. La correcte insertion du gène d'intérêt est contrôlée par PCR, en utilisant les amorces M13F / M13R qui ciblent des séquences de part et d'autre de l'insert (Figure 34).



**Figure 34. Résumé des conditions de réalisation des réactions de PCR après clonage des séquences cibles des gènes d'intérêt dans le plasmide PCR 2.1 TOPO.**

Une colonie d'*E. coli* ayant été correctement transformée est repiquée dans 10 ml de milieu « LB + gentamicine (15  $\mu$ g/ $\mu$ l) ». La multiplication, pendant une nuit, des bactéries contenant le gène d'intérêt permet une très forte amplification de celui-ci. A l'issue de cette incubation, les plasmides sont extraits avec le kit « NucleoBond » (Macherey-Nagel, Düren, Allemagne), en suivant le protocole « NucleoBond® Xtra Midi ». Les cultures sont d'abord centrifugées à 6 000 g pendant 10 min à 4°C. Le culot est repris dans 8 ml de tampon RES afin de re-suspendre les cellules, puis 8 ml de tampon de lyse LYS sont



ajoutés. Les étapes de lavage sont ensuite réalisées comme décrit dans le protocole. L'élution est réalisée avec 5 ml de tampon d'élution ELU dans un nouveau tube. Le volume d'éluat est divisé en 6 (833  $\mu$ l par tube eppendorf). Après avoir ajouté 583  $\mu$ l d'isopropanol à l'échantillon, ce dernier est incubé 2 min à température ambiante, puis centrifugé à 11 000 g à 4°C pendant 30 min. Le culot est rincé avec 400  $\mu$ l d'éthanol 70% (centrifugation à 11 000 g pendant 2 min), puis séché durant 10 min à 50°C. Le culot est finalement mis en suspension dans 150 à 300  $\mu$ l d'eau ultra pure et la concentration en plasmide, quantifiée au spectrophotomètre (NanoDrop® ND-1000).

Les séquences d'intérêt sont extraites et amplifiées par PCR, puis purifiées et quantifiées comme précédemment décrit (cf figure précédente + purification §4.1.1 p 119).

---

#### 4.1.3 Transcription *in vitro* des ARNdb et purification

L'étape de transcription *in vitro* est réalisée à l'aide du kit « MegaScript® T7 » (Applied Biosystems, Weiterstadt, Germany). Chaque mélange réactionnel est composé de 2 pmoles d'ADN matrice [1 pmole = (0,7  $\times$  n (paire de base) + 0,8) ng], 8  $\mu$ l de dNTP, 2  $\mu$ l de tampon, 2  $\mu$ l d'enzyme et complété jusqu'à 20  $\mu$ l avec de l'eau. Les tubes sont placés à incuber à 37°C pendant une nuit.

Les ARNdb sont purifiés à l'aide du kit « RNease Mini » (Qiagen) en utilisant le protocole « RNA Cleanup ». 80  $\mu$ l d'eau fournie dans le kit, 350  $\mu$ l de tampon RLT et 250  $\mu$ l d'éthanol absolu sont ajoutés aux échantillons. Les mélanges sont déposés sur colonne à filtre et centrifugés à 11 000 g pendant 15 s. Deux lavages avec 500  $\mu$ l de tampon RPE sont effectués (centrifugation à 11 000 g), le premier pendant 15 s et le second durant 2 min. Les ARNdb sont finalement élués dans 33  $\mu$ l d'eau fournie dans le kit et dosés au spectrophotomètre (NanoDrop® ND-1000).

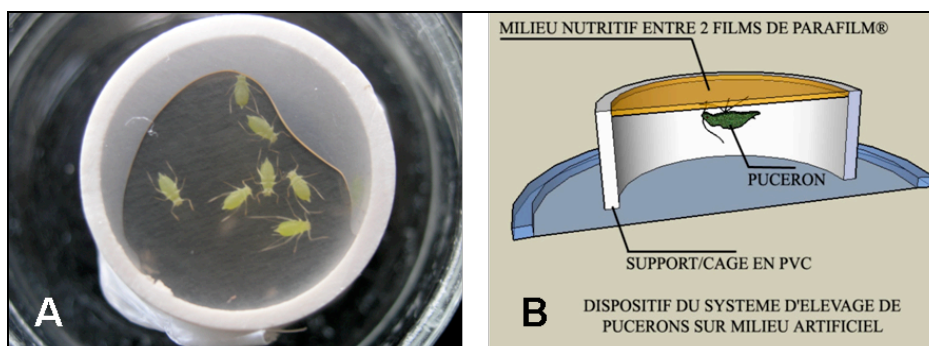
---

## 4.2 Méthode d'administration des ARNdb

### 4.2.1 Administration de l'ARNdb par ingestion

Pour l'administration par ingestion, les larves sont issues d'un élevage synchronisé comme décrit précédemment (cf Matériel et Méthodes §1.1.2 p 90). Les larves L1, âgées de 0 à 24 h, sont placées sur le milieu artificiel Ap3 (Figure 35). Ce milieu a été mis au point à partir de l'analyse de la composition en acides aminés du puceron *Acyrtosiphon pisum* élevé sur plantes (Febvay, *et al.*, 1988) et comprend, en plus des acides aminés, du

saccharose, des vitamines, des minéraux et divers oligo-éléments (Tableau 4).



**Figure 35. Milieu artificiel pour l'élevage de pucerons.**

A) Photo représentant des pucerons sur milieu artificiel.

B) Coupe schématique d'une cage d'élevage des pucerons sur milieu artificiel (photo et schéma réalisés par Luc Abate, UMR BF2I).

**Tableau 4. Composition du milieu nutritif Ap3.**

	mM		mg pour 100 ml
<b>Acides aminés</b>		<b>Saccharose</b>	20 000
Alanine	20,06	<b>Vitamines</b>	
Béta-Alanine	0,7	Acides p-aminobenzoïque	10
Arginine	14,06	Acide L-ascorbique	100
Asparagine H <sub>2</sub> O	19,88	Biotine	0,1
Acide Aspartique	6,63	D-panthothénate de Calcium	5
Cystéine	2,44	Chlorure de Choline	50
Cystine	0	Acide Folique	1
Acide Glutamique	10,15	i-inositol anhydre	42
Glutamine	30,49	Amide Nicotinique	10
Glycine	22,19	Pyridoxine HCl	2,5
Histidine HCl H <sub>2</sub> O	6,49	Riboflavine	0,5
Isoleucine	12,56	Thiamine HCl	2,5
Leucine	17,65	<b>Métaux traces</b>	
Lysine HCl	19,22	CuSO <sub>4</sub> 5H <sub>2</sub> O	0,47
Méthionine	4,85	FeCl <sub>3</sub> 6H <sub>2</sub> O	4,45
Ornithine HCl	0,56	MnCl <sub>2</sub> 4H <sub>2</sub> O	0,65
Phénylalanine	17,83	NaCl	2,54
Proline	11,23	ZnCl <sub>2</sub>	0,83
Sérine	11,83	<b>Autres</b>	
Thréonine	10,67	Citrate de Calcium	10
Tryptophane	2,09	Benzoate de Cholestérol	2,5
Tyrosine	2,13	MgSO <sub>4</sub> 7H <sub>2</sub> O	242
Valine	16,29	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	250

Après cinq jours, les larves ont atteint le troisième stade larvaire (L3) et sont réparties, de manière randomisée en 3 groupes : 1 groupe contrôle (larves L3 transférées sur le même milieu Ap3) et 2 groupes traités (larves L3 transférées sur milieu Ap3 contenant 7 pmoles/ $\mu$ l d'un des

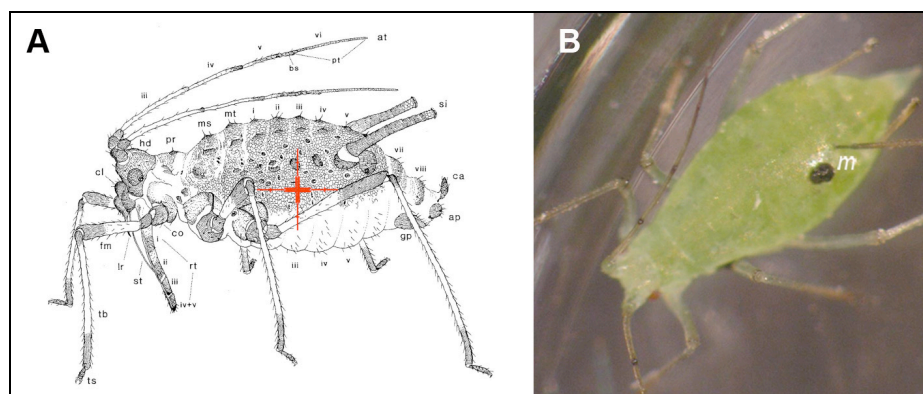
ARNdb, EGFP ou ACYPI007803, préparés précédemment). Après 48 h de traitement, les individus sont replacés sur de jeunes plants de fève.

Pour la préparation des milieux, 4 ml de milieu Ap3 sont concentrés 2 fois (Ap3-2X) par évaporation sous vide (SpeedVac) pendant 3 h. Pour chaque cage de 6 puits, les 24  $\mu$ l de milieu nécessaires sont préparés avec 12  $\mu$ l de milieu Ap3-2X et 12  $\mu$ l d'ARNdb (dilués à 14 pmoles/ $\mu$ l dans de l'eau ultra pure). Pour le milieu Ap3 servant de contrôle, 12  $\mu$ l d'eau sont ajoutés aux 12  $\mu$ l de milieu Ap3-2X.

Les cages sont disposées sur un support noir et placées en insectarium dans les conditions contrôlées décrites pour les élevages (cf. Matériel et Méthodes §1.1.1 p 89).

#### 4.2.2 Administration de l'ARNdb par injection

Des larves L1 (0-24 h) issues d'un élevage synchronisé sont maintenues 5 jours sur plantes jusqu'à atteindre le stade L3. Les larves sont alors réparties en 3 groupes : 1 groupe contrôle injecté avec 46 nl d'eau ultra pure autoclavée, et 2 groupes traités avec 46 nl d'une solution d'ARNdb (EGFP ou ACYPI007803) à 7 pmole/ $\mu$ l dans de l'eau. Pour les injections, les insectes sont immobilisés par aspiration sur un dispositif adéquat et la solution est administrée grâce à un micro-injecteur (nanoinject II, Drummond Scientific, Broomall, PA). La zone d'injection est localisée à mi-distance entre la troisième paire de pattes et la cornicule (Figure 36). Après injection, les pucerons sont replacés sur de jeunes plants de fève disposés en insectarium dans les mêmes conditions que celles des élevages.



**Figure 36. Localisation du point d'injection des ARNdb pour la réalisation des expériences d'interférence par l'ARN.**

**A)** L'injection s'effectue latéralement entre la dernière paire de pattes et la cornicule (croix rouge).

**B)** Exemple d'un puceron correctement injecté. Une petite zone de mélanisation (*m*) se forme au point de piqûre.

---

### 4.3 Suivi de mortalité et de fécondité

Afin de déceler un éventuel effet du traitement par ARN interférent sur la mortalité et la fécondité, les pucerons sont suivis quotidiennement durant une période de 15 jours.

Pour les deux modes d'administration, 30 larves L3 sont suivies (sur plante ou sur milieu artificiel) par groupe de traitement. Chaque jour, les pucerons morts sont dénombrés et retirés.

A compter du quatrième jour de suivi, les pucerons atteignent le stade adulte et commencent à pondre. Sur les 30 pucerons de chaque groupe, 20 sont conservés dans les mêmes conditions pour continuer le suivi de la mortalité, et les 10 autres sont isolés afin de réaliser un suivi individuel de la fécondité (les larves pondues sont dénombrées pour chaque femelle et retirées toutes les 24 h pendant 11 jours).

---

### 4.4 Suivi de l'expression du gène ACYPI007803

Afin de mesurer l'effet des ARN interférents sur l'expression du gène ACYPI007803, les transcrits de ce gène sont quantifiés par RT-PCR en temps réel. Quatre individus de chacune des 3 conditions d'injection sont collectés 24 h, 72 h et 120 h à compter du premier jour de traitement et disséqués dans du tampon A (cf. Matériel et Méthodes §1.2 p 90). Lors de cette dissection, quatre compartiments du corps sont isolés : les chaînes embryonnaires, la carcasse (incluant la tête), le tube digestif et les bactériocytes maternels, et plongés dans du « RNaseZap » (Ambion) avant d'être conservés à -80°C.

Les ARN totaux sont extraits en utilisant le kit « RNeasy Mini » (Qiagen) selon le protocole précédemment décrit. Les ARN sont élués dans 30  $\mu$ l d'eau et quantifiés au spectrophotomètre. Afin d'éliminer tout risque de contamination par des ADNg, les échantillons sont traités par une DNase (DNase I, Promega, Madison, WI, USA). 8  $\mu$ l d'ARN (20 ng/ $\mu$ l) sont incubés 30 min à 37°C en présence d'1  $\mu$ l de tampon et d'1  $\mu$ l de DNase I.

Les échantillons étant issus de tissus d'un seul individu, les ARN extraits sont peu concentrés (entre 5 à 100 ng/ $\mu$ l en fonction des tissus). Pour cette raison, les transcriptions inverses de ces échantillons sont réalisées à l'aide du kit « Sensiscript® RT » (Qiagen), qui permet de réaliser des réactions de RT optimales à partir de faibles quantités d'ARN. 14,5  $\mu$ l de mix sont ajoutés à 5,5  $\mu$ l d'ARN totaux, les échantillons sont ensuite incubés 1 h à 37°C.

La qualité des ADNc est vérifiée par PCR comme décrit dans le paragraphe « Validation des échantillons » (cf. Matériel et Méthodes §3.6.1.3 p 110).

Les protocoles et programmes de PCR en temps réel utilisés lors dans cette analyse sont identiques à ceux utilisés lors de la validation des données de puce par RT-PCR en temps réel (cf Matériel et Méthodes §3.6.3.1 p 114 et §3.6.3.3 p 116).

Afin de quantifier les changements de niveau du transcrite du gène d'intérêt, les 3 conditions de traitement (eau, EGFP, gène d'intérêt) sont représentés dans chaque microplaque. Une microplaque de 96 puits permet de quantifier les niveaux des transcrits de 4 individus par condition pour le gène de normalisation et le gène d'intérêt à raison de trois réplicats par échantillon (Figure 37).

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	Blanc	D1	D2	D3	D4	D5	D6	D7	D8			
B	Eau n°1	Eau n°2	Eau n°3	Eau n°4	EGFP n°1	EGFP n°2	EGFP n°3	EGFP n°4	7803 n°1	7803 n°2	7803 n°3	7803 n°4
C	Eau n°1	Eau n°2	Eau n°3	Eau n°4	EGFP n°1	EGFP n°2	EGFP n°3	EGFP n°4	7803 n°1	7803 n°2	7803 n°3	7803 n°4
D	Eau n°1	Eau n°2	Eau n°3	Eau n°4	EGFP n°1	EGFP n°2	EGFP n°3	EGFP n°4	7803 n°1	7803 n°2	7803 n°3	7803 n°4
E	Blanc	D1	D2	D3	D4	D5	D6	D7	D8			
F	Eau n°1	Eau n°2	Eau n°3	Eau n°4	EGFP n°1	EGFP n°2	EGFP n°3	EGFP n°4	7803 n°1	7803 n°2	7803 n°3	7803 n°4
G	Eau n°1	Eau n°2	Eau n°3	Eau n°4	EGFP n°1	EGFP n°2	EGFP n°3	EGFP n°4	7803 n°1	7803 n°2	7803 n°3	7803 n°4
H	Eau n°1	Eau n°2	Eau n°3	Eau n°4	EGFP n°1	EGFP n°2	EGFP n°3	EGFP n°4	7803 n°1	7803 n°2	7803 n°3	7803 n°4

**Figure 37. Organisation de la plaque 96 puits utilisée pour les expériences de RT-PCR en temps réel après injection d'ARNdb.**

En violet, le gène de normalisation ACYPI000064 (actine), et en orange, le gène ACYPI007803. Pour chaque gène, un témoin négatif (« Blanc ») est réalisé avec de l'eau. De même, une gamme étalon à 8 points (D1 à D8) est effectuée pour chaque gène de la plaque à partir de produits de PCR. L'expression du gène ACYPI007803 est quantifiée dans un tissu (carcasse ou chaînes embryonnaires ou bactériocytes ou tube digestif) appartenant à 4 individus (de n°1 à n°4) à raison de 3 réplicats par individu, pour les trois traitements (injection d'eau (bleu), d'ARNdb EGFP (vert), d'ARNdb ACYPI007803 (rouge)).

Les données sont normalisées et analysées selon la méthode précédemment décrite (cf Matériel et Méthodes §3.6.4 p 117).

# Partie III – Résultats



# 1 Etude des besoins en acides aminés au cours du développement du puceron du pois

## 1.1 Problématique de l'étude

## 1.2 Composition en acides aminés

## 1.3 Développement d'un système de culture pour les embryons du puceron du pois

## 1.4 Discussion

---

### 1.1 Problématique de l'étude

De nombreuses études métaboliques et de radiotraçage, conduites sur milieu artificiel en conditions contrôlées, ont montré que *B. aphidicola* fournit les acides aminés essentiels au puceron pour son développement larvaire lorsque ces acides aminés sont absents de l'alimentation de cet insecte (Douglas, 1988 ; Febvay, *et al.*, 1995 ; Febvay, *et al.*, 1999 ; Liadouze, *et al.*, 1996). En complément de ces approches, les études sur les embryons sont indispensables afin de pouvoir comprendre, par la suite, les bases métaboliques et physiologiques des premières étapes de la mise en place de l'association symbiotique entre *B. aphidicola* et le puceron du pois.

Les comparaisons de profils en acides aminés réalisées par Douglas et collaborateurs en 1996 mettent en évidence des besoins métaboliques différents des ovaires par rapport à ceux de l'ensemble des tissus des adultes (Douglas, 1996). Par la suite, les études réalisées par Wilkinson et Ishikawa (1999, 2000), ont montré que les tissus embryonnaires (tout stade confondu) étaient capables de puiser, dans l'hémolymphe de la mère, les acides aminés dont ils ont besoin pour leur développement. Ces auteurs montrent également que certains acides aminés seraient plus importants que d'autres au bon développement des embryons (Wilkinson, *et al.*, 1999 ; 2000). Malgré ces quelques approches, les études sur les besoins nutritionnels des embryons de puceron du pois restent rares à cause de la difficulté à isoler les embryons et du manque de protocoles adaptés à leur mise en culture. De plus, à ce jour, aucune étude n'a caractérisé les besoins métaboliques des embryons parthénogénétiques tout au long de leur développement.



Le premier objectif de ce travail de thèse a été de déterminer les exigences en acides aminés des embryons de puceron du pois au cours de leur développement. La première étape a été l'isolement d'embryons de stades différents et l'analyse de leurs pools en acides aminés totaux et libres par chromatographie en phase liquide (HPLC), compositions qui peuvent être révélatrices de certaines déficiences nutritionnelles, voire d'insuffisances ou de mécanismes régulateurs de leur métabolisme azoté. Afin de pouvoir différencier par la suite l'implication de chaque compartiment (maternel, embryonnaire et symbiotique) dans la nutrition des embryons, j'ai par la suite mis au point un système de culture pour embryons de pucerons. Enfin, j'ai réalisé le suivi de croissance d'embryons sur milieux plus ou moins riches en acides aminés et analysé leur réponse métabolique, avant et après développement sur ces milieux, par comparaison de leurs pools en acides aminés.

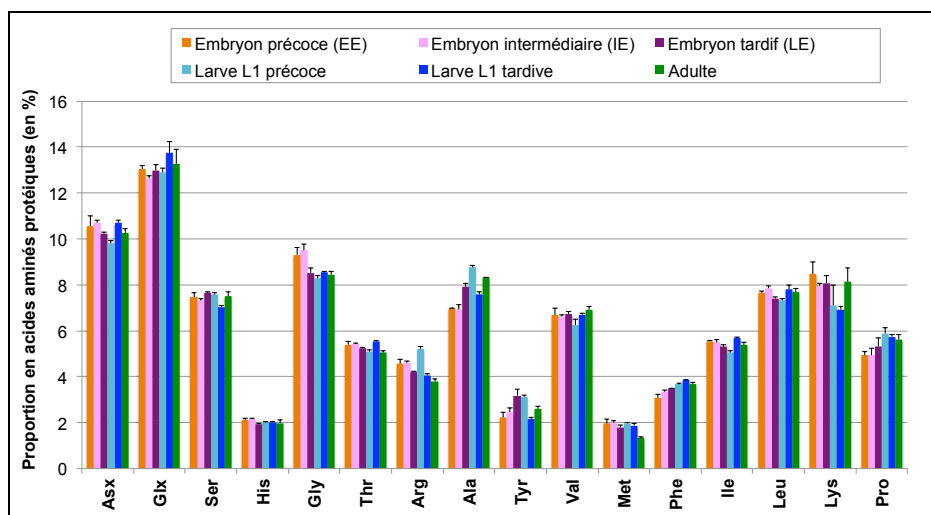
---

## 1.2 Composition en acides aminés des embryons au cours du développement

Afin d'appréhender les besoins métaboliques en acides aminés au cours du développement embryonnaire, l'analyse des acides aminés libres (AAL) et des acides aminés protéiques (AAP) [calculés par différences entre les concentrations en AAT (acides aminés totaux) et AAL] a été réalisée sur trois groupes de stades embryonnaires (précoces (EE), intermédiaires (IE), et tardifs (LE)). Comme dans les études antérieures (Douglas, 1996 ; Wilkinson, *et al.*, 1999) réalisées sur le compartiment embryonnaire, nous avons comparé les profils obtenus avec ceux du stade adulte (adulte âgé de 11 jours). Les analyses ont également été conduites sur le premier stade larvaire (L1), qui est consécutif au stade embryonnaire LE, et représente le premier stade de développement autonome de la mère. Nous avons choisi de différencier les larves L1 qui sont nouvellement pondues (larves L1 précoces, moins de 6 heures après la ponte), des larves L1 tardives (âgées entre 13 et 19 heures après la ponte).

La concentration totale en acides aminés protéiques en nmole/individu (moyenne  $\pm$  SE) est égale à  $9,71 \pm 0,41$  (embryon EE,  $n = 4$ ),  $15,1 \pm 1,0$  (embryon IE,  $n = 5$ ),  $51,6 \pm 2,0$  (embryon LE,  $n = 5$ ),  $71,8 \pm 1,8$  (larve L1 précoce,  $n = 5$ ),  $70,1 \pm 4,3$  (larve L1 tardive,  $n = 4$ ) et  $1741 \pm 94$  (adulte,  $n = 4$ ). Ceci correspond à une teneur respective en protéines exprimée en  $\mu\text{g}/\text{individu}$  de  $1,06 \pm 0,05$  (embryon EE),  $1,65 \pm 0,11$

(embryon IE),  $5,65 \pm 0,22$  (embryon LE),  $7,87 \pm 0,20$  (larve L1 précoce),  $7,66 \pm 0,48$  (larve L1 tardive) et  $189 \pm 10$  (adulte).



**Figure 38. Comparaison de la composition en acides aminés protéiques entre les embryons de stades différents, le premier stade larvaire et l'adulte.**

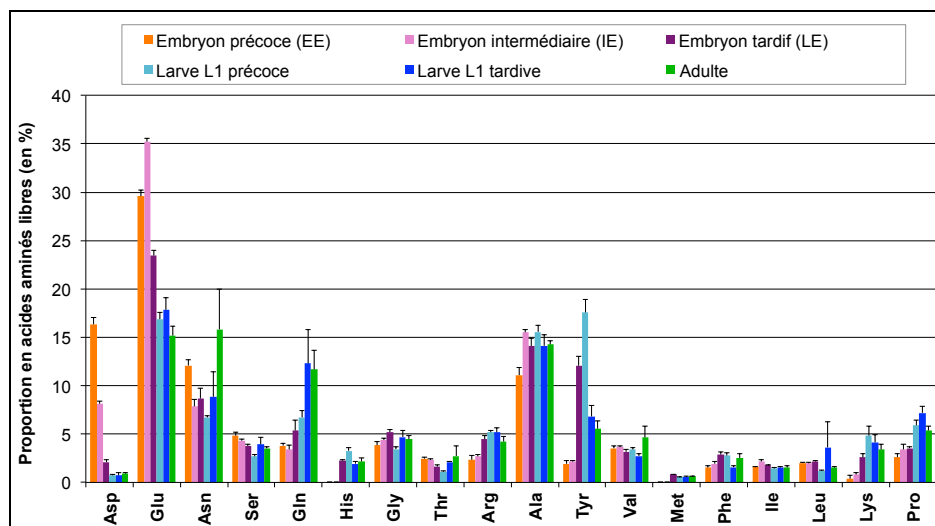
Toutes les valeurs sont exprimées en %. Les pourcentages moyens et leur erreur standard (représentée par la barre d'erreur) sont calculés après normalisation par la transformation angulaire (arcsinus de la racine carrée de la proportion). Le nombre de répétitions est compris entre 4 et 5 selon les groupes d'individus. Suite à l'hydrolyse pour analyse des AAT, Asx = Asp + Asn et Glx = Glu + Gln.

La comparaison des profils en acides aminés protéiques des différents stades de développement est présentée dans la Figure 38. Les valeurs correspondent à la proportion de chaque acide aminé protéique, exprimée en pourcentage, par rapport à l'ensemble des acides aminés protéiques. La méthode de quantification par HPLC utilisée ne permet pas la détection de la cystéine et du tryptophane, de plus, l'analyse du pool d'acides aminés totaux nécessitant une étape d'hydrolyse, l'asparagine et la glutamine sont hydrolysés en acide aspartique et glutamique respectivement ainsi seulement 16 acides aminés ont été reportés pour les acides aminés protéiques. On remarque la grande similarité des profils entre les différents groupes. Cette homogénéité de la composition en acides aminés protéiques dans l'ensemble des stades n'est pas surprenante et reflète l'homéostasie du compartiment protéique chez le puceron.

Afin d'appréhender les besoins métaboliques en acides aminés de différents individus, la comparaison du pool des acides aminés libres (pool utilisé pour la biosynthèse des protéines) est plus instructive.

La concentration totale en acides aminés libres exprimée en nmole/ $\mu$ g de protéine (moyenne  $\pm$  SE) est égale à  $1,45 \pm 0,06$  (embryon EE,  $n = 4$ ),  $1,22 \pm 0,03$  (embryon IE,  $n = 5$ ),  $1,42 \pm 0,04$  (embryon LE,  $n = 5$ ),

1,18 ± 0,09 (larve L1 précoce, n = 5), 1,22 ± 0,17 (larve L1 tardive, n = 4) et 1,20 ± 0,12 (adulte âgé de 11 jours, n = 4). L'analyse de ces données par ANOVA ne révèle aucune différence significative entre les six groupes de développement ( $F_{5,21} = 1,73$ ,  $P = 0,17$ ).



**Figure 39. Comparaison de la composition en acides aminés libres entre les embryons de stades différents, le premier stade larvaire et l'adulte.**

Toutes les valeurs sont exprimées en %. Les pourcentages moyens et leur erreur standard (représentée par la barre d'erreur) sont calculés après normalisation par la transformation angulaire (arcsinus de la racine carrée de la proportion). Le nombre de répétitions est compris entre 4 et 5 selon les groupes d'individus.

La comparaison des profils en acides aminés libres des différents stades de développement est présentée dans la Figure 39. Chaque valeur correspond à la proportion de chaque acide aminé libre, exprimée en pourcentage par rapport à l'ensemble des acides aminés libres.

Pour l'histidine et la méthionine, les concentrations obtenues pour les stades embryonnaires EE et IE sont inférieures aux limites de quantification de la méthode. Pour deux acides aminés (l'asparagine et la leucine) aucune variation significative de proportion n'a été observée entre tous les groupes. Pour les autres acides aminés, globalement au cours du développement, nous observons deux sortes de profils avec des concentrations relatives en acides aminés montrant une tendance continue soit à la diminution soit à l'augmentation. Les acides glutamique et aspartique ( $P < 0,0001$ ) appartiennent au premier groupe. La proportion en acide aspartique diminue progressivement de 16,3 % chez les embryons précoces (EE) à 0,7 % dans les larves L1 (0,9 % au stade adulte). La proportion en acide glutamique montre aussi une diminution au stade adulte (15,2 %) avec la plus grande proportion observée pour le stade embryonnaire IE (35,2 %).

Parmi les 12 acides aminés dont le profil présente une augmentation au cours du développement, quatre montrent des différences hautement significatives ( $P < 0,0001$ ) : l'arginine, la lysine, la proline et la tyrosine. La plus grande variation au cours du développement est observée pour la tyrosine avec les embryons tardifs (LE) présentant une forte proportion (12,1 %) de cet acide aminé, ce qui représente une concentration six fois plus élevée comparée aux embryons précoces (EE). Cette augmentation se poursuit chez les larves L1 précoces pour atteindre 17.6 %, puis diminue rapidement à 6.8 % chez les larves L1 tardives (5,5 % chez les adultes).

---

### 1.3 Développement d'un système de culture pour les embryons du puceron du pois

L'analyse des profils d'acides aminés libres des embryons fraîchement disséqués permet d'appréhender les besoins métaboliques des embryons en soulignant en particulier les acides aminés dont l'utilisation au cours du développement est plus importante que les apports. Toutefois ces apports peuvent être de différentes origines qui restent à déterminer. Les embryons dépendent-ils fortement du compartiment maternel ou satisfont-ils par eux-mêmes à leurs besoins grâce notamment à une symbiose embryonnaire fonctionnelle ? L'isolement des embryons du compartiment maternel et leur maintien en milieux de culture sont un préalable indispensable à toute étude visant à répondre à ces questions.

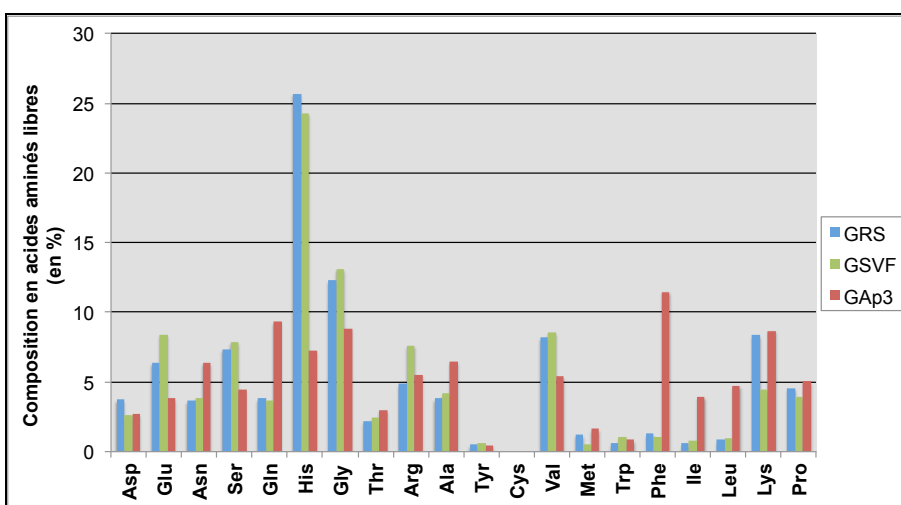
---

#### 1.3.1 Survie, développement et croissance des embryons sur différents milieux artificiels

Afin d'évaluer l'importance de la contribution du compartiment maternel dans la fourniture d'acides aminés aux embryons et le niveau d'exigence de ces derniers face au milieu dans lequel ils se développent, des embryons ont été isolés et mis en culture dans les milieux de culture ayant des compositions (quantité totale et équilibres relatifs) en acides aminés différentes.

Trois milieux de culture ont été testés avec les embryons ayant atteint un stade de développement avancé (LE), qui se sont révélés les plus faciles à être manipulés. Le milieu de Grace (GRS), milieu utilisé pour la culture de cellules d'insectes, le milieu GSVF constitué du milieu GRS complétement avec 10 % de sérum de veau fœtal, couramment utilisé pour la culture d'embryons, et le milieu GAp3 composé du milieu GRS

complémenté avec les acides aminés du milieu Ap3, milieu nutritif artificiel utilisé pour l'élevage du puceron du pois.



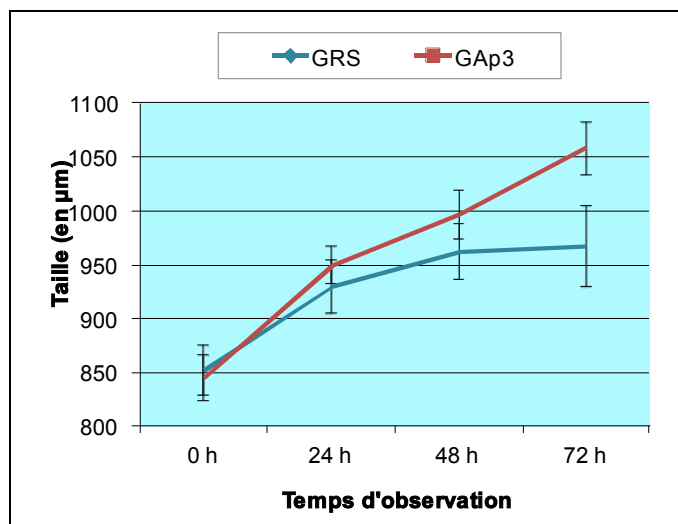
**Figure 40. Composition (mol%) en acides aminés libres des trois milieux de culture testés.**

En bleu le milieu GRS, en vert le milieu GSVF et en rouge le milieu GAp3.

Concernant la composition en acides aminés libres de ces milieux, on note qu'elle est assez similaire entre les milieux GRS ou GSVF d'une part et GAP3 d'autre part (Figure 40). Celles-ci sont déduites de la composition en acides aminés d'insectes et plus particulièrement de l'hémolymphe de *Anthrea eucalypti* (Grace, 1962) pour le GRS et du puceron *Acyrtosiphon pisum* (Febvay, *et al.*, 1988 ; Febvay, *et al.*, 1999) pour le milieu GAp3. La concentration en acides aminés libres des milieux GRS et GSVF est basse (respectivement  $59,51 \pm 0,06$  et  $53,44 \pm 0,10$  nmoles/ $\mu$ l). La concentration en acides aminés libres du GSVF est 10% plus faible que celle du GRS compte tenu de la dilution du milieu GRS avec du SVF (10 %), toutefois, le rôle potentiel de ce dernier est d'apporter d'autres éléments (comme des facteurs de croissance, vitamines, etc). Dans le milieu GAp3, la supplémentation en acides aminés libres est conséquente : on multiplie presque par 6 la concentration totale en AA libres qui est de  $334,14 \pm 0,93$  nmoles/ $\mu$ l.

Un suivi préliminaire de développement d'embryons LE mis en culture a été réalisé sur 12 embryons par type de milieu. La croissance des embryons en fonction du temps de mise en culture a été observée sur une période de 72 h. Si aucune différence n'a été constatée entre les milieux de culture pour les temps 24 et 48 h, la croissance relative à 72 h est supérieure pour le milieu GAp3 (+25 %) comparée à celles obtenues sur milieu GSVF (+12 %) ou sur milieu GRS (+13 %).

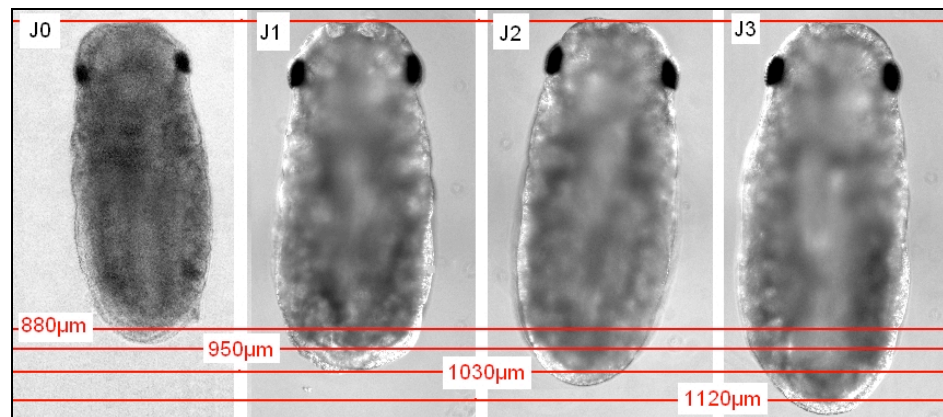
Contrairement à ce qui avait été supposé, la supplémentation du milieu de Grace avec du sérum de veau n'induit pas une meilleure croissance des embryons. Aussi, dans la suite des expérimentations, nous avons restreint l'étude aux deux milieux GRS et GAp3.



**Figure 41.** Suivi de la taille moyenne des embryons tardifs (LE) au cours des 72 h de culture sur milieu GRS (en bleu) et GAp3 (en rouge). Pour chaque temps d'observation la moyenne et l'erreur standard sont représentées (n = 18).

Dans les deux milieux de culture, les embryons LE restent viables pendant le suivi sur 72 h : des mouvements sont observés pendant tout le temps de mise en culture et les yeux se modifient pour atteindre leur aspect définitif (couleur et forme). L'évolution de la taille moyenne des embryons LE au cours des 72 h de culture dans le milieu GAp3 est représentée en rouge sur la **Figure 41**. La taille moyenne aux temps 0 h et 72 h est respectivement de  $852 \pm 21 \mu\text{m}$  et  $1058 \pm 38 \mu\text{m}$ , ce qui correspond à une augmentation après 72 h de culture de 25 % de la taille initiale.

L'évolution de la taille moyenne des embryons LE au cours des 72 h de culture dans le milieu GRS est représentée en bleu dans la **Figure 41**. La taille moyenne aux temps 0 h et 72 h est respectivement de  $852 \pm 21 \mu\text{m}$  et  $967 \pm 24 \mu\text{m}$ , ce qui correspond à une augmentation d'environ 13,5 % au cours des 72 h de culture. Dans ce milieu de culture, les embryons LE ne croissent plus après 48 h et montrent une croissance significativement inférieure à celle des embryons mis en culture dans le milieu GAp3 après 72 h de culture ( $P < 0.05$ ). Le suivi de la mortalité des embryons en culture *in vitro* met aussi en évidence une différence du taux de survie après 72 h. En effet, pour le milieu GRS, on dénombre une mortalité de 33 % à l'issue de la culture alors que ce taux n'est que de 6 % sur le milieu GAp3.

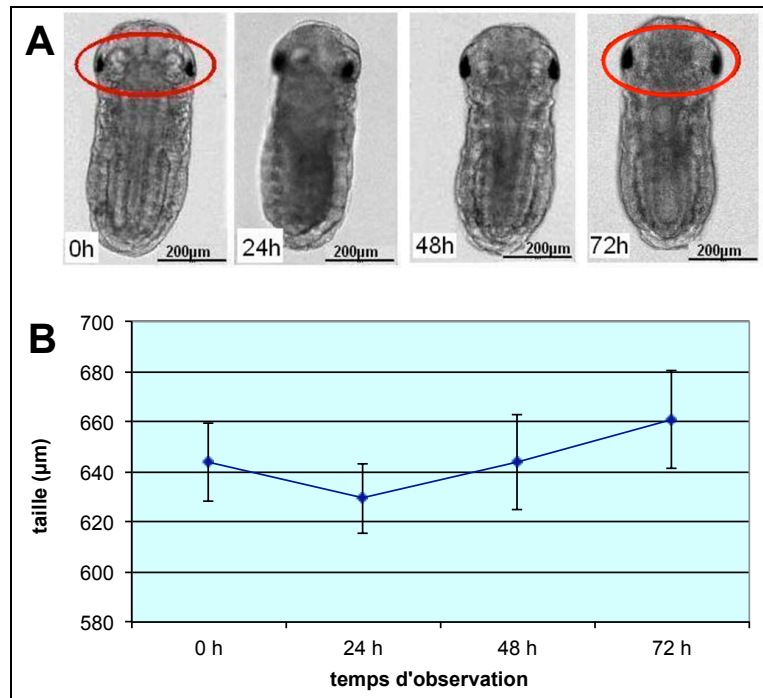


**Figure 42. Suivi d'un embryon LE au cours de sa mise en culture dans le milieu GAp3.**

Microphotographies réalisées toutes les 24 h durant la culture. La taille de l'embryon est reportée en rouge pour chaque point d'observation.

La teneur en acides aminés libres des milieux a ainsi un effet important sur la croissance et la survie des embryons, les meilleures performances étant obtenues pour le milieu GAp3 (**Figure 41, Figure 42**), milieu dont la concentration totale en AA libres est multipliée presque par 6 par rapport au milieu GRS et dont la composition s'inspire de celle du puceron *A. pisum*.

Le milieu GAp3 ayant été montré comme le plus approprié à la culture des embryons LE en comparaison avec les autres milieux testés, nous avons alors testé ce milieu pour la culture *in vitro* des embryons plus précoces (EE, IE).



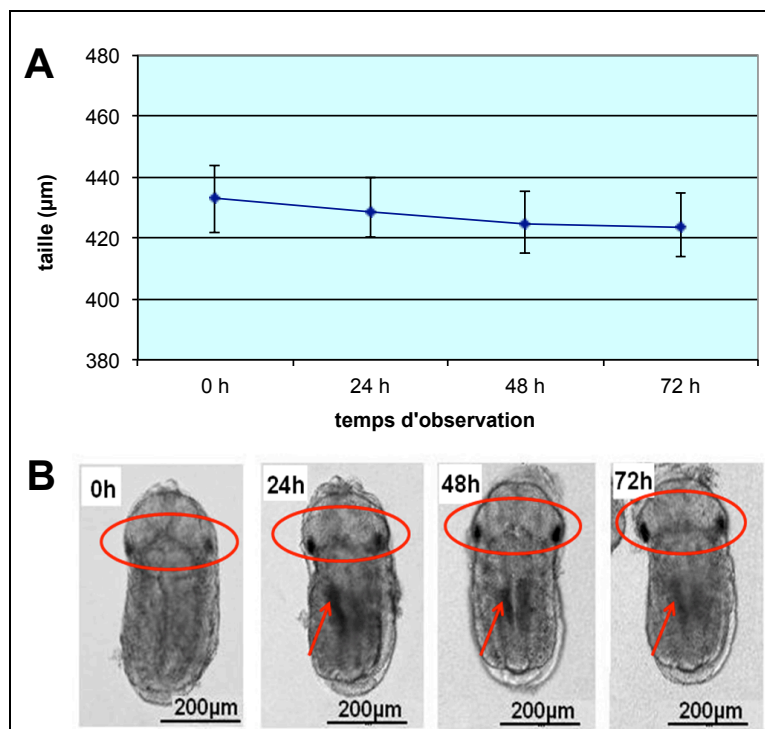
**Figure 43. Suivi d'embryons IE durant 72 h de culture en milieu GAp3.**

**A)** Microphotographies d'un embryon IE au cours de sa mise en culture. On peut remarquer l'évolution de la pigmentation des yeux (cercles rouges).

**B)** Suivi de l'évolution de la taille moyenne des embryons IE au cours de la culture. Pour chaque temps d'observation la moyenne et l'erreur standard sont représentées (n = 12).

Les embryons intermédiaires (IE) restent viables pendant les 72 h de culture sur milieu : comme pour les embryons LE, des mouvements de contraction sont observés sous microscope et l'on constate une accentuation de la pigmentation des yeux (Figure 43A). Néanmoins, la taille moyenne de ces embryons diminue au cours des 24 premières heures de culture puis augmente en moyenne d'environ 30 µm, au cours des 48 dernières heures de culture (Figure 43B). Le test de régression linéaire ne révèle pas de corrélation significative entre la croissance des embryons et le temps de culture.





**Figure 44. Suivi d'embryons EE durant 72 h de culture en milieu GAP3.**

**A)** Microphotographies d'un embryon EE au cours de sa mise en culture. On peut remarquer l'évolution de la pigmentation des yeux (cercles rouges) ainsi que celle du corps (flèches).

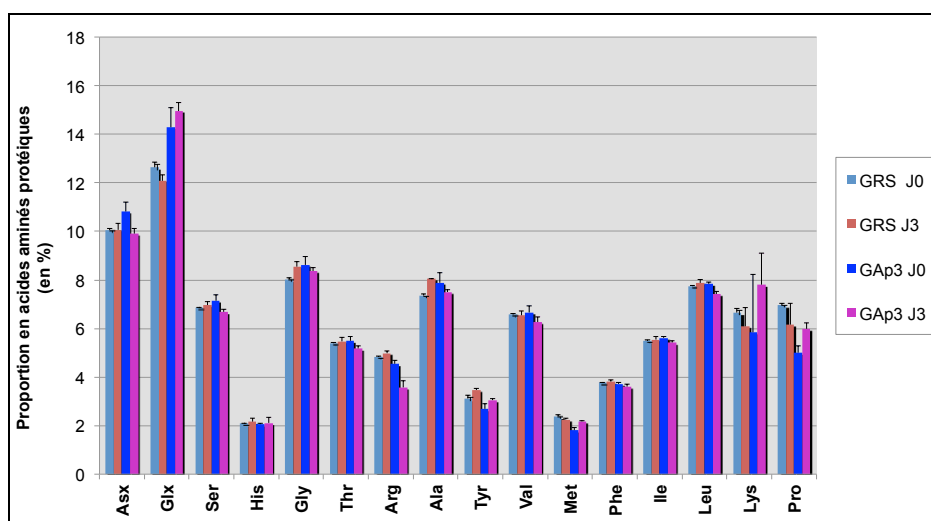
**B)** Suivi de l'évolution de la taille moyenne des embryons EE au cours de la culture. Pour chaque temps d'observation la moyenne et l'erreur standard sont représentées (n = 12).

Le suivi des embryons EE mis en culture dans le milieu GAP3 montre que leur taille moyenne n'est pas significativement différente entre 0 et 72 h (respectivement  $433 \pm 11$  et  $423 \pm 10 \mu\text{m}$ ) (Figure 44A). Cependant, ces embryons semblent viables : même si les embryons précoces montrent très rarement des mouvements, on observe, avec le temps, l'apparition des yeux et de la pigmentation abdominale qui caractérise les embryons à des stades plus avancés (Figure 44B).

### 1.3.2 Réponses métaboliques des embryons en culture

Dans une deuxième étape de mon travail j'ai étudié plus précisément la réponse métabolique (métabolisme azoté) des embryons LE aux variations de composition en acides aminés des milieux de culture. Cette réponse a été quantifiée par l'analyse de la composition en acides aminés protéiques et libres des embryons avant et après 72 h de culture dans les milieux GRS et GAP3.

Afin d'évaluer la synthèse protéique au cours des 72 heures de mise en culture, la teneur initiale en protéine (à J0) des embryons LE est comparée avec celle après culture (à J3). Pour les embryons cultivés dans le milieu GRS, aucune augmentation significative n'est observée ( $5,93 \pm 0,45$  contre  $6,41 \pm 0,38 \mu\text{g}$  de protéine par embryon à J3 et J0 respectivement,  $P = 0,23$ ). En revanche, pour le milieu GAp3, la teneur en protéine des embryons après 3 jours de culture est significativement plus élevée que celle des embryons initiaux ( $6,31 \pm 0,25$  contre  $5,41 \pm 0,22 \mu\text{g}$  de protéine par embryon respectivement à J3 et à J0 ;  $P = 0,03$ ).



**Figure 45. Comparaison de la composition en acides aminés protéiques des embryons LE avant mise en culture (J0) et après trois jours de culture dans les milieux GRS et GAp3.**

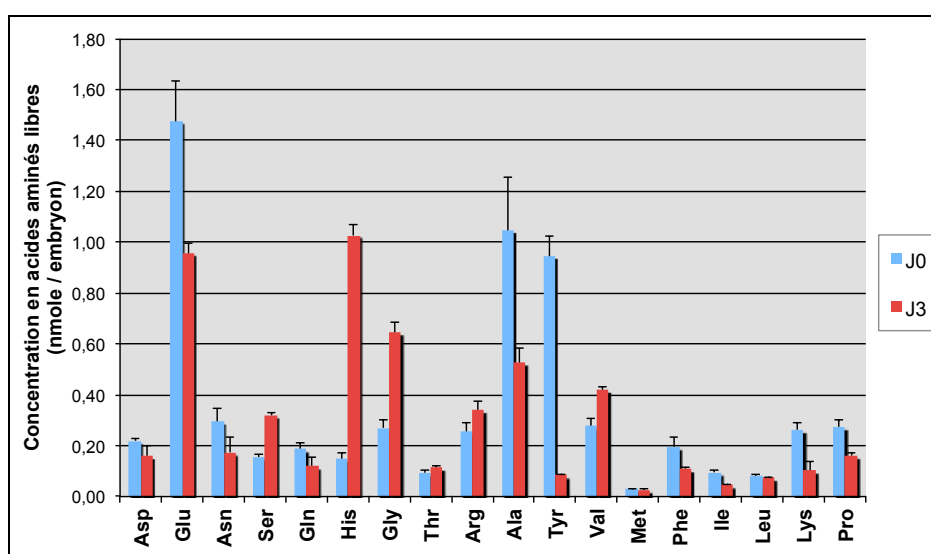
Toutes les valeurs sont exprimées en %. Les pourcentages moyens sont calculés après normalisation par une transformation angulaire (arc sinus de la racine carrée).

Les proportions en acides aminés protéiques des embryons LE avant et après culture sont présentés dans la Figure 45. L'analyse du compartiment protéique montre une grande similarité des profils d'acides aminés entre les embryons fraîchement isolés de la mère (J0) et les embryons maintenus en culture durant 3 jours et ceci quel que soit le milieu de culture. Cette homogénéité de la composition en acides aminés protéiques reflète, une fois encore, l'homéostasie du compartiment protéique et témoigne ici de l'intégrité des embryons maintenus pendant 3 jours sur milieu artificiel.

La taille et la composition du pool des acides aminés libres, reflet des mécanismes régulateurs gérant l'ensemble du métabolisme azoté de l'organisme, sont comparées chez les embryons avant et après 3 jours de culture sur chacun des deux milieux testés.

### 1.3.2.1 Réponse des embryons LE en milieu GRS

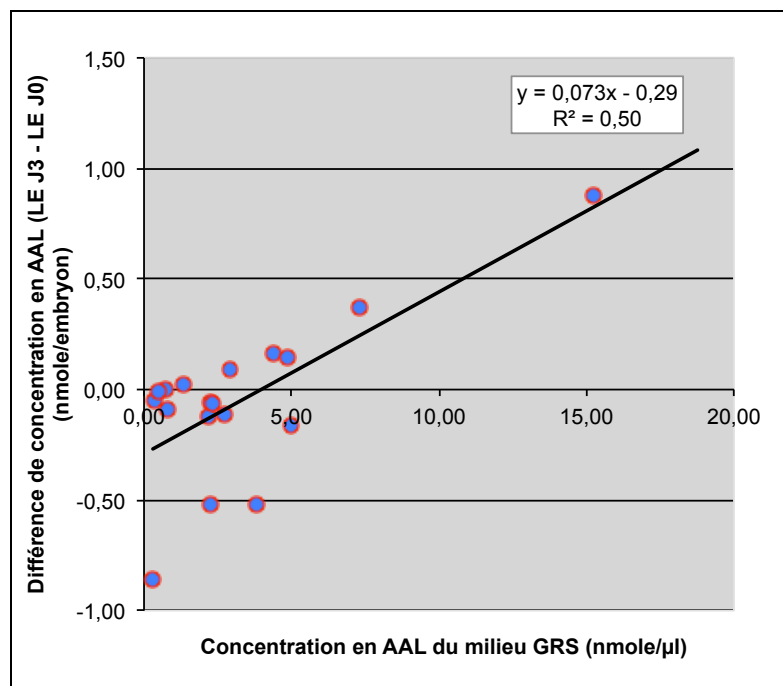
La concentration totale en acides aminés libres n'est pas significativement différente entre les embryons tardifs avant et après 3 jours de culture dans le milieu GRS : respectivement  $6,31 \pm 0,71$  contre  $5,41 \pm 0,10$  nmole par embryon ( $P = 0,33$ ) [exprimée en nmole par  $\mu\text{g}$  de protéine, ces concentrations correspondent à  $0,98 \pm 0,05$  et  $0,92 \pm 0,08$  respectivement à J0 et J3]. Les concentrations individuelles en acides aminés libres des embryons avant (J0) et après 3 jours (J3) de culture sur GRS sont reportées dans la Figure 46.



**Figure 46. Comparaison des concentrations en acides aminés libres des embryons LE avant mise en culture (J0) et après trois jours de culture (J3) dans les milieux GRS.**

Toutes les valeurs sont exprimées en nmole par embryon (moyenne  $\pm$  SE,  $n = 5$ ).

Après trois jours de culture dans le milieu GRS, un certain nombre d'acides aminés montre des concentrations plus élevées par rapport à J0. Quatre acides aminés (His, Ser, Gly, Val) augmentent significativement, la plus forte différence étant observée pour l'histidine (590 % d'augmentation). Quant à la glycine, la serine et la valine, leur concentration augmente respectivement de 240 %, 100 % et 50 %. D'autres acides aminés voient en revanche leur concentration diminuer à J3 par rapport à J0. Parmi ceux-ci, 5 varient significativement (Glu, Tyr, Ile, Lys et Pro), cette différence étant la plus marquée pour la tyrosine ( $P = 0,004$ , 90 % de diminution). La glutamine, qui constitue l'acide aminé libre le plus représenté (1,47 nmole/embryon soit 17,5 % des acides aminés libres) dans les embryons LE à J0 montre une diminution de concentration de 35 % ( $P = 0,038$ ). Quant à l'isoleucine, la proline et la lysine, leur concentration diminue respectivement de 50 %, 40 % et 20 %.

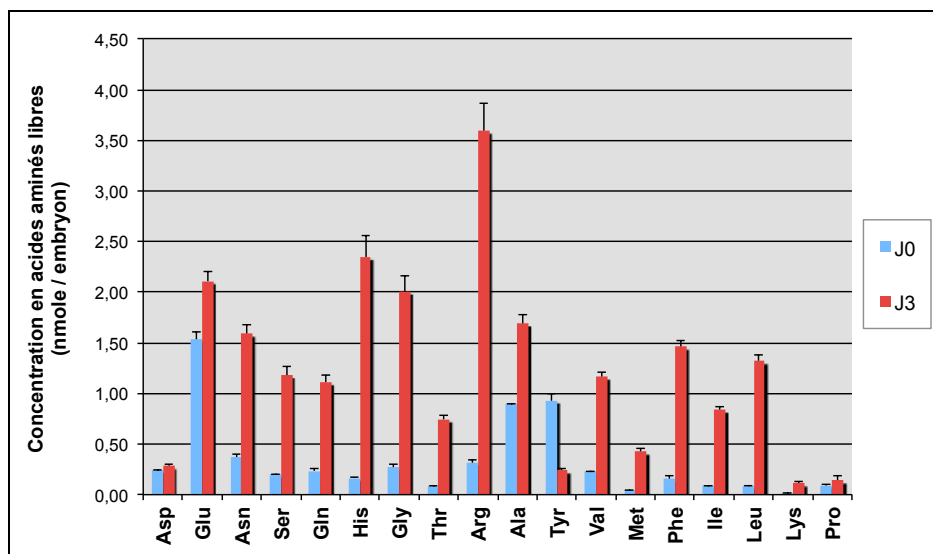


**Figure 47. Corrélation entre le bilan (J3-J0) des acides aminés libres dans les embryons après culture sur le milieu GRS et la concentration en acides aminés libres du milieu.**

Afin d'apprécier l'importance du métabolisme des embryons, nous avons analysé la corrélation entre les différences de concentration observées chez les embryons après et avant culture et les concentrations en acides aminés du milieu de culture (Figure 47). Après 3 jours de culture sur milieu GRS, le bilan en acides aminés libres (= concentration à J3 – concentration à J0) dans les embryons reflète assez fidèlement la concentration du milieu GRS, la corrélation étant hautement significative ( $P < 0,001$  ;  $R^2 = 0,50$ ).

#### 1.3.2.2 Réponse des embryons LE en milieu GAp3

La concentration totale en acides aminés libres augmente significativement dans les embryons LE après 3 jours de culture dans le milieu GAp3 :  $22,4 \pm 1,1$  contre  $5,94 \pm 0,27$  nmole par embryon, respectivement à J3 et J0 ( $P < 0,001$ ) [exprimée en nmole par  $\mu\text{g}$  de protéine, ces concentrations correspondent à  $3,54 \pm 0,12$  et  $1,10 \pm 0,01$  respectivement à J3 et J0]. Les concentrations individuelles en acides aminés libres des embryons avant (J0) et après 3 jours de culture sur GRS (J3) sont reportées dans la Figure 48.



**Figure 48. Comparaison des concentrations en acides aminés libres des embryons LE avant mise en culture (J0) et après trois jours de culture (J3) dans le milieu GAP3.**

Toutes les valeurs sont exprimées en nmole par embryon (moyenne  $\pm$  SE, n = 5).

Sur les 18 acides aminés, 16 ont une concentration significativement plus élevée dans les embryons à J3 par rapport à celle des embryons à J0. Ces augmentations sont très importantes avec, pour certains acides aminés, des concentrations après 3 jours de culture dépassant de plus de dix fois la teneur initiale. Après culture, l'arginine constitue ainsi l'acide aminé libre prépondérant dans les embryons ( $3,59 \pm 0,27$  nmole/embryon) avec une augmentation d'environ 1050 %. Comme pour la culture sur milieu GRS, nous observons également une concentration élevée en histidine chez les embryons après 3 jours de culture (augmentation de 1300 %).

Les deux acides aminés dont la concentration n'augmente pas dans le pool AAL sont d'une part la proline (pas de différence significative entre les concentrations à J0 et à J3,  $P = 0,16$ ) et la tyrosine (diminution significative,  $P = 0,03$ ). Il est ainsi remarquable que la tyrosine soit le seul acide aminé dont la concentration diminue dans le pool d'acides aminés libres au cours du développement des embryons sur le milieu GAP3 (diminution de 75 %).

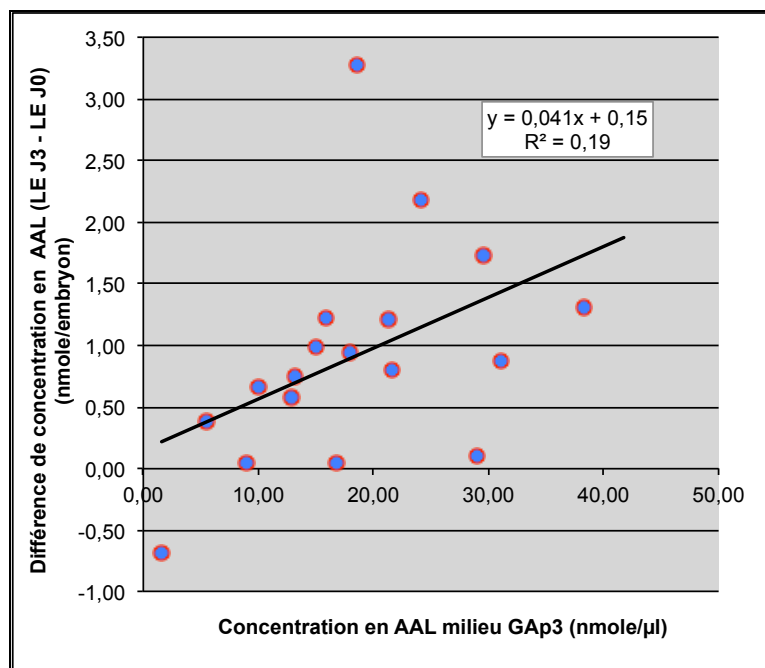


Figure 49. Corrélation entre le bilan (J3-J0) des acides aminés libres dans les embryons après culture sur le milieu GAp3 et la concentration en acides aminés libres du milieu.

Comme précédemment, nous avons examiné l'impact du métabolisme des embryons sur la composition du pool des acides aminés libres en observant la corrélation entre les différences de concentrations observées chez les embryons après et avant culture et les concentrations en acides aminés du milieu de culture (Figure 49). Contrairement aux observations faites avec le milieu GRS, le bilan en acides aminés libres (= concentration à J3 – concentration à J0) des embryons sur milieu GAp3 n'est pas significativement corrélé à la concentration du milieu GAp3 ( $P = 0,08$  ;  $R^2 = 0,19$ ).

#### 1.4 Discussion

La reproduction parthénogénétique est considérée chez les différentes espèces de pucerons (dont en particulier le puceron du pois) comme l'un des facteurs majeurs contribuant à leur succès en tant que ravageurs des cultures. Ce fort potentiel reproductif nécessite une croissance rapide des embryons avec en conséquence un fort besoin nutritionnel, notamment en acides aminés (Bermingham, *et al.*, 2009a ; Wilkinson, *et al.*, 1999). A notre connaissance, notre étude est, dans ce contexte, la première à décrire les exigences nutritionnelles des embryons d'*A. pisum* à différents stades de leur développement parthénogénétique.

Nous avons ainsi, dans un premier temps, étudié la teneur et la composition des acides aminés protéiques et libres de trois groupes d'embryons (précoces : EE, intermédiaires : IE et tardifs : LE), de larves de premier stade (L1 précoces : 0-6 h et L1 tardives : 13-19h) et de pucerons adultes.

Les profils en acides aminés protéiques (exprimés en % de la concentration totale) des différents groupes de développement sont très semblables et ne montrent aucune variation importante en terme de composition en acides aminés quel que soit le stade de développement (embryonnaire ou larvaire) du puceron. Cette similarité des profils reflète, de manière globale, la nature conservée de la composition des protéines.

*A contrario*, les concentrations en acides aminés libres résultent des différences entre apports (métaboliques ou nutritionnels) et utilisations (biosynthèse protéique ou catabolisme); ils sont alors d'importants indicateurs du métabolisme et peuvent révéler des déséquilibres nutritionnels. La comparaison des concentrations totales en acides aminés libres pour l'ensemble des stades n'a révélé aucune différence significative. En revanche, la composition de ce pool d'acides aminés libres présente des différences importantes pour certains acides aminés, entre les groupes de stades étudiés. Douglas (1996) avait déjà montré des différences entre les pools d'acides aminés libres des tissus maternels et des ovaires et soulignait que les pools de ces tissus n'étaient donc pas en équilibre. Notre étude confirme ces différences entre les femelles adultes et les embryons et montre de plus qu'il existe également des variations de profils entre les différents stades embryonnaires. L'acide glutamique et l'acide aspartique sont ainsi retrouvés en plus forte concentration chez les embryons les plus précoces avec une diminution continue de leur concentration au cours du développement. Ces acides aminés qui peuvent être utilisés pour la synthèse d'autres acides aminés, sont, chez le puceron du pois, les principaux précurseurs utilisés par la bactérie symbiotique pour la synthèse des acides aminés essentiels (Liadouze, *et al.*, 1995). Ainsi, Febvay et collaborateurs (Febvay, *et al.*, 1995 ; Liadouze, *et al.*, 1996) montrent par suivi radioactif chez les pucerons symbiotiques, que la synthèse de trois acides aminés essentiels (isoleucine, lysine, thréonine) est réalisée majoritairement à partir des squelettes carbonés du glutamate et de l'aspartate. Wilkinson et Douglas (1996) confirment la conversion de l'acide glutamique marqué au  $^{14}\text{C}$  en d'autres acides aminés et notamment en glutamine, proline, acide aspartique, lysine et thréonine chez le puceron symbiotique. L'évolution de la proportion de l'acide glutamique et de l'acide aspartique dans les différents stades embryonnaires laisse donc supposer une utilisation croissante de ces acides aminés au cours du

développement, entraînant la diminution de leur stock dans le pool des acides aminés libres.

D'autres acides aminés (arginine, lysine, proline et tyrosine) montrent au contraire une augmentation de leur concentration dans le pool des acides aminés libres au cours du développement embryonnaire. La variation la plus importante est observée pour la tyrosine avec une plus forte proportion dans les embryons tardifs (LE), pour lesquels la concentration en tyrosine est six fois plus élevée que dans les embryons précoces. En comparant ces résultats à ceux obtenus pour le premier stade larvaire (L1), on observe que la proportion en tyrosine reste élevée pour les larves âgées de moins de 6 h mais que celle-ci diminue fortement chez les larves L1 tardives (âgées de 13 à 19 h). Ce profil suggère que cet acide aminé est accumulé durant le développement embryonnaire pour une utilisation massive pendant le premier stade larvaire. La tyrosine est connue pour être un précurseur métabolique des composés participant à la mélanisation et au tannage quinonique des protéines cuticulaires lors du durcissement après la mue. L'augmentation significative de la concentration en tyrosine au cours du développement embryonnaire peut être à rapprocher au pic pré-ecdysial de cet acide aminé décrit chez de nombreux insectes (Rahbé, *et al.*, 1986). Cette proportion importante de tyrosine pourrait alors représenter le stockage de cet acide aminé aromatique dans l'embryon avant son hydroxylation en composés catécholiques servant, après la ponte, à la synthèse de pigments et au tannage cuticulaire par la voie de la  $\beta$ -sclérotisation ou du tannage quinonique.

Le précurseur de la tyrosine est la phénylalanine qui présente, au cours du développement embryonnaire, un profil de variation similaire à la tyrosine mais à un niveau de significativité plus faible. L'importance de la phénylalanine pour le développement embryonnaire a été montré chez les pucerons du pois et il a été suggéré que sa concentration était limitante chez les pucerons aposymbiotiques pour la croissance des embryons (Douglas, 1996). Ce besoin essentiel en phénylalanine pour les embryons est confirmé par Wilkinson et Ishikawa (1999) qui montrent que la totalité de la phénylalanine radiomarquée injectée dans l'hémolymphe d'une femelle parthénogénétique adulte est retrouvée dans le compartiment embryonnaire. La faible variation de la concentration en phénylalanine observée dans les embryons durant leur développement, sous-entend qu'elle est gérée en "flux tendu" entre son entrée dans le pool libre des acides aminés et sa transformation en tyrosine. Les forts besoins en phénylalanine des embryons, établis dans les études précédemment citées, seraient ainsi liés au stockage de tyrosine pour une utilisation ultérieure



après la ponte. La phénylalanine utilisée pour la synthèse de tyrosine serait alors en grande partie d'origine maternelle, mais, comme cela a été démontré chez le puceron adulte (Febvay, *et al.*, 1999 ; Wilson, *et al.*, 2010), une néosynthèse avec la participation des bactéries symbiotiques embryonnaires peut également être possible.

De manière générale, toutes ces données indiquent que les exigences métaboliques du puceron de pois évoluent au cours du développement embryonnaire et soulignent l'importance d'étudier séparément, dans la mesure du possible, les différents stades embryonnaires.

Dans la deuxième partie de notre travail, nous avons développé un système de culture à court terme adapté aux embryons tardifs (LE) du puceron du pois. Outre les facilités qu'apporte un système d'étude *in vitro*, l'objectif de cette approche est de simuler le compartiment maternel afin de mieux appréhender son rôle possible dans l'approvisionnement en nutriments des embryons. Le développement des embryons (taux de croissance) et l'évolution de leur composition en acides aminés ont été comparés après 72 h de culture dans différents milieux. Cette étude, réalisée sur les embryons tardifs (LE) qui se sont révélés les plus faciles à être manipulés, a porté sur le milieu GRS, le milieu GSVF complémenté en sérum de veau fœtal et le milieu GAP3 complémenté en acides aminés.

Le milieu GRS, déjà utilisé pour la culture de *B. aphidicola* dans des cellules d'insectes (Darby, *et al.*, 2006), est adapté à la culture d'embryons de pucerons comme le montre la croissance significative des embryons LE après 72 h. L'addition de sérum de veau fœtal (milieu GSVF) n'apporte aucune amélioration significative pour le développement des embryons du puceron. Ce sérum de veau fœtal est un additif largement utilisé en culture cellulaire et pour la culture des embryons d'insectes (Counce, 1966). La concentration en acides aminés du milieu de culture montre par contre un effet important sur la croissance des embryons, comme révélé par la meilleure performance de croissance et la plus faible mortalité après 72 h de culture sur le milieu GAP3 complémenté en acides aminés. Ceci corrobore les résultats obtenus par Bermingham et Wilkinson (2010), avec le puceron *Aphis fabae*, montrant une diminution significative de la croissance des embryons maintenu 24 h sur un milieu carencé en acides aminés essentiels. Dans nos expériences sur milieu GRS ou GSVF, la croissance des embryons LE est ainsi probablement affectée par les quantités limitantes d'acides aminés essentiels.

La croissance des embryons EE et IE en milieu GAp3 n'est pas significative mais l'apparition ou l'accentuation de caractères comme le développement des yeux (EE et IE), la pigmentation verte chez les embryons EE ou encore le maintien des mouvements de contraction (IE) suggère la survie de ces embryons. Il est envisageable que ces derniers dépendent encore beaucoup du compartiment maternel et que l'apport en nutriments par le milieu de culture ou éventuellement par leurs bactéries symbiotiques ne soit pas suffisant compte tenu de leurs besoins nutritionnels. Ainsi, les ressources nutritives seraient allouées en priorité à l'évolution architecturale de l'embryon plutôt qu'à sa croissance. On peut également supposer que d'autres éléments provenant du compartiment maternel tels que des hormones ou des vitamines soient aussi nécessaires pour un développement optimum de ces jeunes embryons.

Le métabolisme azoté des embryons LE mis en culture ainsi que leurs besoins en acides aminés ont été appréhendés par l'analyse de leurs acides aminés protéiques et libres avant et après trois jours de culture sur les milieux GRS et GAp3.

Après 3 jours d'incubation, nous n'observons pas de synthèse protéique significative pour les embryons LE sur milieu GRS contrairement à ceux sur milieu GAp3 qui présentent une augmentation significative (+ 16 %) de leur teneur en protéines. Ceci est à corrélérer directement avec la faible croissance observée pour les embryons sur milieu GRS et leur croissance plus élevée sur milieu GAp3. La teneur en acides aminés du milieu GRS, près de 6 fois plus faible que celle du milieu GAp3, ne permet pas un apport suffisant pour couvrir les besoins de l'embryon nécessaires à sa synthèse protéique. Cette synthèse protéique étant un processus séquentiel, la déficience en certains acides aminés particuliers peut suffire pour la bloquer. L'analyse détaillée des compositions en acides aminés libres des embryons peut répondre en partie à cette interrogation.

La composition des embryons après culture diffère en effet selon le milieu de culture utilisé. De manière globale, nous montrons en premier lieu une forte corrélation entre le bilan en acides aminés libres (=concentration à J3- concentration à J0) et la concentration en acides aminés dans le milieu GRS qui révèle une entrée non-spécifique des acides aminés du milieu vers l'embryon. L'existence d'un stylet fonctionnel, ou pour le moins ouvert, chez l'embryon âgé pourrait expliquer une entrée indifférenciée des nutriments dans l'embryon, mais en l'état de nos connaissances actuelles, ceci ne peut être qu'une hypothèse. De plus, il est important à noter que, dans nos conditions de culture *in vitro*, les embryons, isolés des ovarioles, baignent directement dans le milieu de

culture. Ceci est différent de la situation *in vivo*, où les embryons sont séparés de l'hémolymphe maternelle par la gaine ovarienne (tube mésodermique épithélial). La corrélation entre les acides aminés "assimilés" durant les 3 jours de culture par l'embryon et la concentration dans le milieu disparaît pour le milieu GAp3. Ceci est le résultat du métabolisme plus intense des embryons sur milieu GAp3 : l'utilisation spécifique d'acides aminés pour la synthèse protéique voire pour le métabolisme global (production d'énergie) conduit à la modification du pool interne d'acides aminés libres.

La plus forte augmentation en acides aminés libres dans les embryons après 3 jours d'incubation (milieu GRS et milieu GAp3) est observée pour l'histidine. Cet acide aminé est celui en plus forte proportion dans le milieu GRS ( $\approx 25\%$ ) et son apport est ainsi très supérieur aux besoins de l'embryon. Ceci reste vrai pour l'embryon sur milieu GAp3, bien que la synthèse protéique active nécessite un apport d'histidine plus important. Avec le milieu GAp3, c'est la concentration en arginine qui augmente le plus dans les embryons incubés pendant 3 jours. Cet acide aminé a été montré comme excédentaire dans le milieu Ap3, conduisant à son excrétion dans le miellat par les pucerons élevés sur ce milieu artificiel (Febvay, *et al.*, 1999). Le milieu GAp3, complété avec les acides aminés de ce milieu Ap3, montre ainsi un apport d'arginine excédentaire pour les besoins de l'embryon, entraînant l'importante augmentation de sa teneur dans le pool des acides aminés libres.

Au contraire de l'histidine et de l'arginine, on observe, pour certains acides aminés, la diminution de leur concentration dans les embryons après culture sur les milieux testés. Pour les embryons incubés dans le milieu GRS, la plus forte diminution concerne la tyrosine (90 % de diminution par rapport à J0). Ceci indique que les besoins de l'embryon en tyrosine sont supérieurs aux apports, conséquence d'une concentration limitante de cet acide aminé aromatique dans le milieu GRS. Quatre autres acides aminés (acide glutamique, isoleucine, lysine et proline) présentent également une diminution significative de leur concentration dans l'embryon après culture dans le milieu GRS. Ainsi, comme pour la tyrosine, la concentration de ces acides aminés est limitante dans le milieu de culture GRS. L'ensemble de ces acides aminés est alors probablement à l'origine de l'arrêt de la biosynthèse protéique chez les embryons incubés dans ce milieu et le ralentissement consécutif de leur développement. En ce qui concerne les embryons incubés dans le milieu GAp3, la tyrosine est le seul acide aminé dont la concentration diminue dans les embryons après 3 jours de culture (diminution de 70 %). Par rapport au milieu GRS, le milieu GAp3 a été complété de manière importante en tous les acides aminés

et seule la tyrosine reste en concentration limitante pour le développement des embryons. Comme pour l'ensemble des autres acides aminés (à l'exception de la tyrosine), les apports de phénylalanine apparaissent excédentaires dans les conditions de développement des embryons sur milieu GAp3. Toutefois et bien que la néosynthèse de tyrosine soit possible chez le puceron à partir de la phénylalanine (Febvay, *et al.*, 1999 ; Wilson, *et al.*, 2010), cet excès de phénylalanine ne suffit pas à compenser les déficiences en tyrosine. Nous pouvons ainsi supposer que la vitesse de cette conversion métabolique n'est pas suffisante pour assurer les besoins en tyrosine des embryons. Compte tenu de nos résultats d'analyse des embryons au cours de leur développement *in vivo*, outre la synthèse de protéines, les besoins importants en tyrosine de l'embryon soulignés ici, doivent répondre aux nécessités de stockage pour une utilisation ultérieure après la ponte.

Cette étude sur les embryons du puceron du pois nous a permis de mettre en évidence le rôle important des acides aminés dans le développement embryonnaire. La position clé de la tyrosine est soulignée avec probablement une fonction cruciale dans le contexte des protéines cuticulaires et des processus de leur sclérotisation et de leur tannage.



## 2 Analyse du transcriptome du puceron du pois au cours de son développement embryonnaire et larvaire

### 2.1 Problématique de l'étude

### 2.2 Analyse globale du transcriptome

### 2.3 Analyse fonctionnelle des gènes variant significativement au cours du développement

### 2.4 Enrichissement des classes fonctionnelles de gènes

### 2.5 Validation des données de puces par RT-PCR en temps réel

---

### 2.1 Problématique de l'étude

Les études métaboliques réalisées dans la première partie de ma thèse mettent en évidence une évolution des besoins en acides aminés du puceron du pois au cours de son développement embryonnaire et larvaire. Notamment, nous avons montré des besoins particuliers en acides aminés aromatiques, qui se sont révélés limitants pour la croissance des embryons de stade avancé et importants pour le passage des stades embryonnaires à larvaires. Bien que l'isolement des embryons et leur mise en culture aient apporté des éléments de réponse quant au possible rôle de chacun des compartiments (embryonnaire et maternel) dans la nutrition des embryons, les éléments ainsi que les niveaux de régulation de ces voies sont encore méconnus.

Le récent projet de séquençage et d'annotation du génome du puceron du pois (IAGC, 2010) a permis la mise en place d'outils dédiés à l'analyse du transcriptome de cet insecte, tout particulièrement grâce à la puce à ADN « ACYPI v1.0 » développée dans notre unité. Le deuxième volet de ma thèse a donc consisté en une approche de transcriptomique globale ayant comme objectif l'analyse de l'évolution des profils d'expression des gènes au cours du développement embryonnaire et larvaire de l'insecte afin d'identifier les voies et gènes primordiaux de l'association symbiotique avec *B. aphidicola*. L'analyse de ces données sera centrée tout particulièrement sur les régulations du métabolisme, en

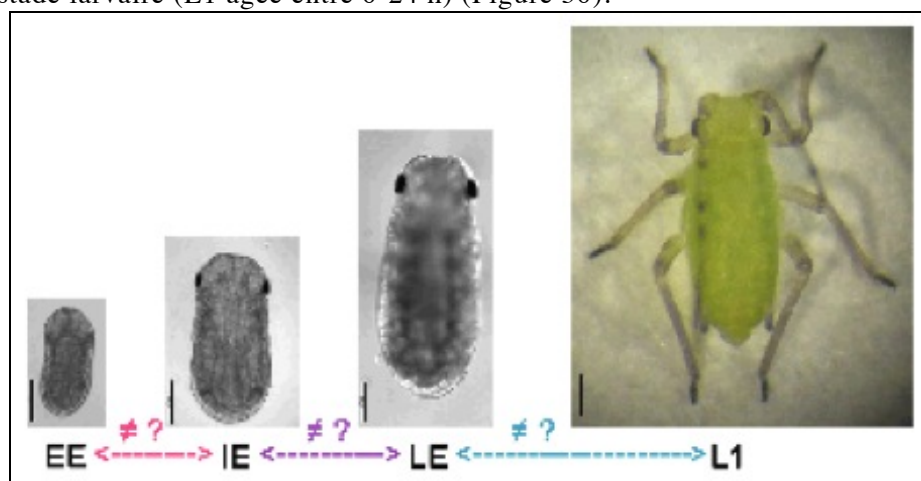
particulier celui des acides aminés, éléments centraux dans la relation avec la bactérie symbiotiques et qui sont essentiels à un développement harmonieux de l'insecte.

Notre étude représente une première étape clé dans l'identification de nouvelles cibles de cette symbiose pendant le développement parthénogénétique du puceron du pois, ceci dans l'objectif de développer de nouvelles stratégies de contrôle de ce redoutable ravageur des cultures.

## 2.2 Analyse globale du transcriptome

### 2.2.1 Analyse de la qualité des échantillons

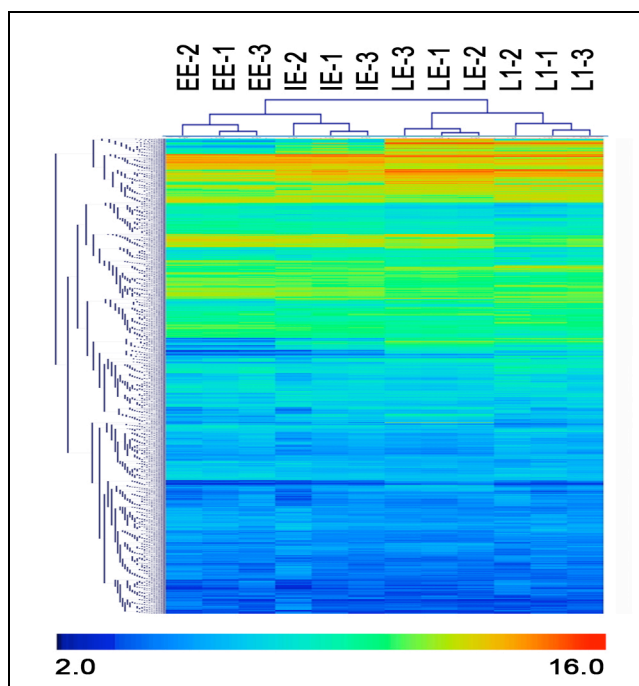
Nous avons basé notre analyse du transcriptome du puceron du pois au cours de son développement embryonnaire et larvaire sur la comparaison des profils d'expression de quatre groupes de stades de développement : les embryons précoces (EE = stades 15 et 16), les embryons intermédiaires (IE = stades 17 et 18), les embryons tardifs (LE = stades 19-20) et le premier stade larvaire (L1 âgée entre 0-24 h) (Figure 50).



**Figure 50.** Groupes de stades de développement analysés dans l'étude transcriptomique et comparaisons réalisées.

L'analyse statistique des données (après normalisation) a été précédée par une analyse de qualité des échantillons. Pour cela, à l'aide du logiciel MeV (MultiExperiment Viewer : <http://www.tm4.org/mev/>), nous avons sélectionné les 50 % de gènes qui montrent le plus de variations entre toutes les conditions expérimentales (12 005 gènes) et qui apportent ainsi le plus d'informations pour classer les échantillons et différencier les groupes de stades de développement. A partir de ces données, nous avons, dans un deuxième temps, effectué un classement hiérarchique non

supervisé (HCL) des échantillons en fonction de leurs profils d'expression (Figure 51).



**Figure 51. Classification hiérarchique non supervisée des 12 005 gènes les plus variants à l'aide du logiciel MeV.**

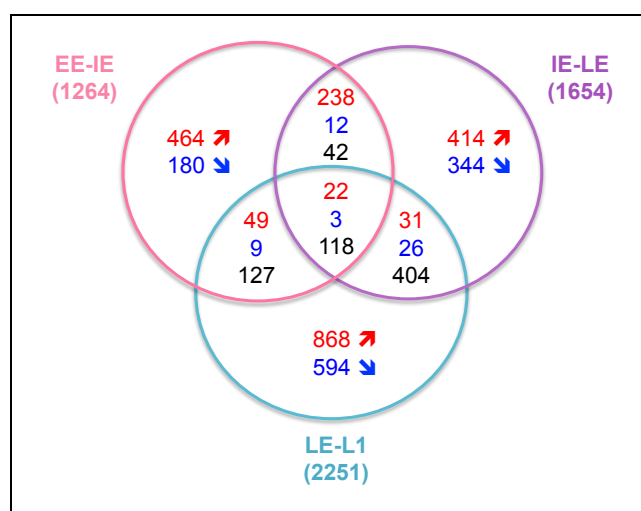
Il s'agit d'une double classification : horizontalement, les échantillons sont classés selon leur profil global d'expression, et verticalement, les gènes sont regroupés selon leur expression. Les classifications sont basées sur des distances euclidiennes. L'intensité des expressions est exprimée en  $\log_2$  et s'étend sur une échelle de 2 à 16. Sont indiqués : en bleu, les gènes faiblement exprimés et, en rouge, les gènes fortement exprimés.

A l'issue de cette classification, on constate que quatre groupes de profil d'expression se distinguent clairement. Ceux-ci sont constitués par les trois répétitions biologiques de chacun des groupes de stades étudiés dans ce travail. Ces observations permettent ainsi de conclure à la bonne qualité des dissections et au correct isolement des groupes de stades de développement et donc à la bonne qualité des échantillons.

### 2.2.2 Analyse globale au cours du développement

L'analyse précédente ayant confirmé la bonne qualité de nos données, nous avons ensuite utilisé l'ensemble des données disponibles afin de réaliser l'analyse globale du transcriptome au cours du développement en effectuant les comparaisons suivantes : (a) EE contre IE, (b) IE contre LE (c) LE contre L1 (Figure 50).





**Figure 52. Diagramme de Venn présentant les 3945 gènes différentiellement exprimés dans les trois comparaisons analysées et leur sens de variation.**

Sont représentés : en rouge, le nombre de transcrits dont l'expression augmente au cours du développement, en bleu, le nombre de transcrits diminuant d'expression au cours du développement et, en noir, les transcrits variant d'expression dans deux ou trois comparaisons mais dont le sens de variation change au cours du développement. Les gènes sont considérés comme significativement variants pour  $P < 0,05$  et  $FC \geq 2$ .

Parmi les 24 011 transcrits analysés, 3945 (16,4 %) sont différentiellement exprimés (significativement) au cours du développement du puceron du pois et nous avons identifié respectivement 1264, 1654 et 2251 gènes variant significativement d'expression dans les comparaisons EE-IE, IE-LE et LE-L1 (Figure 52). Cela correspond à une nette augmentation, au cours du développement, du nombre total de gènes différentiellement exprimés. La proportion de gènes dont l'expression augmente, baisse au cours du développement : cela représente respectivement 78,6 %, 66 % et 51,3 % des gènes variants dans les trois comparaisons EE-IE, IE-LE et LE-L1. Cette observation montre que les activations géniques concernent plutôt les stades précoces (comparaison EE-IE) tandis que de nombreux gènes, sans doute plus spécifiques au développement embryonnaire, sont désactivés dans les stades les plus avancés.

L'analyse des intersections entre les comparaisons nous permet, en identifiant les grands changements d'expression, de caractériser les étapes clé du développement de l'insecte. Par exemple, le plus grand nombre de gènes en commun est observé à l'intersection entre les comparaisons IE-LE et LE-L1 avec 461 gènes variant significativement dans ces deux comparaisons. Il est intéressant de noter que, sur ces 461 gènes en commun entre les comparaisons IE-LE et LE-L1, 404 gènes montrent des variations

d'expression de sens opposés. Parmi ces basculements d'expression, 296 gènes (soit près des 3/4) présentent une augmentation d'expression dans la comparaison IE-LE, alors que ces mêmes gènes montrent une diminution d'expression pour la comparaison LE-L1. Cette observation confirme que de nombreux gènes importants pour les étapes les plus précoces du développement sont ensuite réprimés dans les stades les plus avancés. Au contraire, entre les comparaisons EE-IE et IE-LE, nous observons une continuité d'expression pour une grande majorité des gènes communs aux deux comparaisons. En effet, parmi les 292 gènes en commun dans ces deux comparaisons, 250 gènes évoluent dans la même direction avec 238 gènes (plus de 80 % des gènes en commun) dont l'expression augmente au cours du développement. Globalement nos résultats montrent, comme il était plausible de le supposer, que les plus forts changements d'expression génique se situent entre les stades embryonnaires et larvaires.

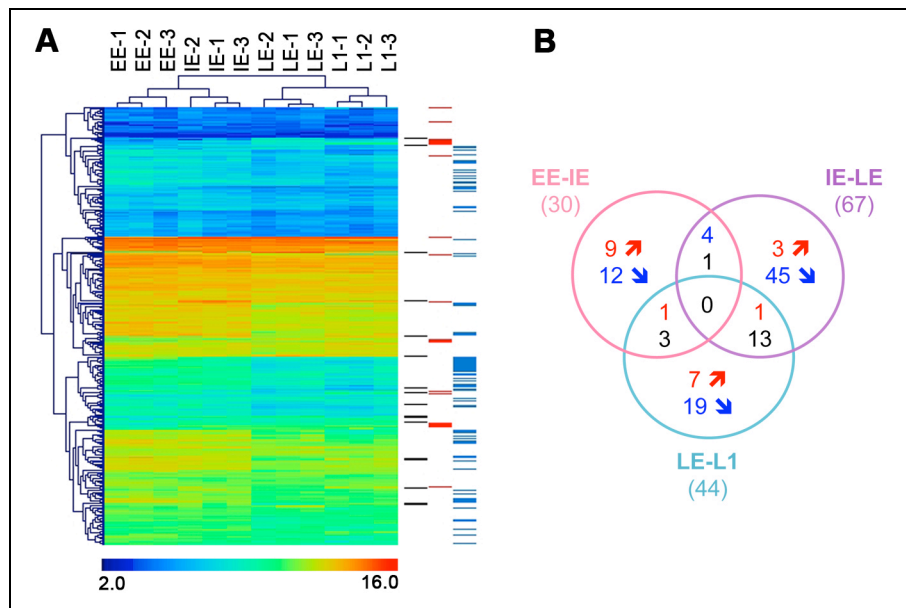
---

### **2.3 Analyse fonctionnelle des gènes variant significativement au cours du développement**

---

#### 2.3.1 Les gènes du développement

Nous nous sommes tout d'abord intéressés à l'analyse des changements d'expression concernant les gènes du développement. Sur les 387 gènes du développement présents dans le génome du puceron du pois, selon l'annotation réalisée par Shigenobu et collaborateurs (2010), 370 sont représentés sur la puce « ACYPI v1.0 ». Parmi ces gènes, 118 (32 %) sont différentiellement exprimés dans au moins l'une des trois comparaisons réalisées (Figure 53)



**Figure 53. Analyse de l'expression des gènes liés au développement chez le puceron de pois.**

**A)** Classification hiérarchique non supervisée (logiciel MeV) des 370 gènes du développement basée sur la similitude des profils d'expression entre les quatre groupes de stades de développement analysés. Le nuancier indiquant les intensités d'expression utilise une échelle en logarithmes de base 2. Les couleurs bleu et rouge représentent respectivement les intensités d'expression les plus basses (2.0) et les intensités les plus fortes (16.0).

**B)** Diagramme de Venn des 118 gènes du développement différentiellement exprimés dans nos trois comparaisons. Sont indiqués : en noir, les gènes communs à 2 ou 3 comparaisons mais ne variant pas dans le même sens ; en rouge, les gènes dont l'expression augmente dans une ou plusieurs comparaisons et, en bleu, les gènes dont l'expression diminue dans une ou plusieurs comparaisons. Ces 118 gènes différentiellement exprimés sont signalés dans la classification hiérarchique selon le même code de couleurs (les 3 échelles situées à droite de la figure A).

Sur les 118 gènes variant significativement d'expression, 80 et 21 gènes diminuent et augmentent respectivement d'expression dans une ou plusieurs comparaisons et 17 gènes sont communs à deux ou trois comparaisons mais ne varient pas dans la même direction au cours du développement (Figure 53A). Au sein des comparaisons EE-IE, IE-LE et LE-L1 nous observons respectivement 30, 67 and 44 gènes variant significativement (Figure 53B ; cf Annexes **Tableau S1 A, B & C**). La majorité des gènes diminuant d'expression au cours du développement se retrouve dans la comparaison IE-LE avec 45 des 80 gènes diminuant d'expression retrouvés exclusivement dans cette comparaison.

Nous avons ensuite effectué une analyse détaillée de deux classes de gènes importants dans le développement embryonnaire et larvaire de

tous les métazoaires, les gènes à homéobox et les gènes appartenant aux voies de signalisation (Tableau 5).

**Tableau 5. Gènes variant significativement d'expression au sein des classes A) des gènes contenant une homéobox et B) des gènes appartenant à des voies de signalisation.**

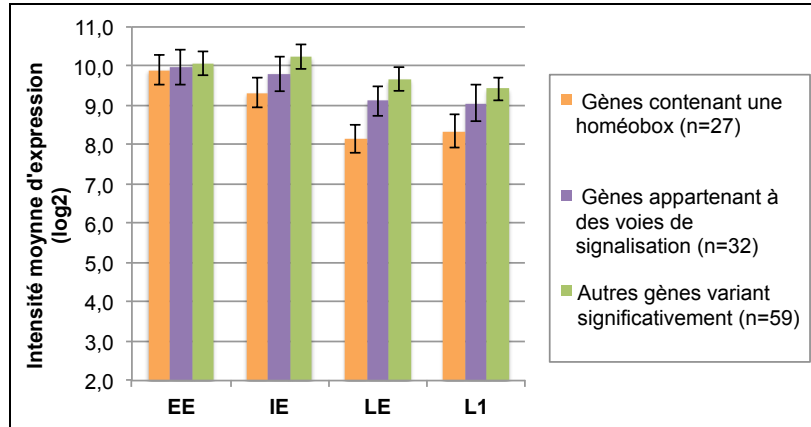
Les flèches bleues indiquent une diminution du niveau d'expression ; les flèche rouges, une augmentation et les tirets, l'absence de variation significative dans une comparaison donnée.

<b>A</b>	Classes	Nom	EE-IE	IE-LE	LE-L1
ANT		<i>Tin</i>	↓	-	-
		<i>Scro</i>	-	-	↓
		<i>En</i>	-	↓	-
		<i>ftz</i>	↓	-	-
		<i>Exex</i>	↗	-	-
		<i>ind</i>	↓	↓	-
		<i>Ubx</i>	-	↓	↗
		<i>Ems</i>	-	↓	-
		<i>Msx1x</i>	↓	↓	-
PRD		<i>Pph13</i>	↗	-	-
		<i>Rx</i>	-	↓	-
		<i>Unc4</i>	-	↓	-
		<i>Gsc</i>	↓	-	-
		<i>Prop</i>	-	↓	-
		<i>Gsb</i>	-	↓	-
LIM		<i>Otx</i>	↓	↓	-
		<i>ap1</i>	-	↓	-
		<i>Lim1</i>	-	↓	-
		<i>Lmxα</i>	↓	-	-
		<i>Lmxβ</i>	↓	-	-
	<i>Tup</i>	-	↓	-	
POU		<i>Pdm3</i>	-	↓	-
SIX		<i>so</i>	-	-	↗
TALE		<i>Exd</i>	-	↓	-
		<i>Hth</i>	-	-	↗
		<i>mirr</i>	-	↓	-
		<i>Ara</i>	-	↓	-

<b>B</b>	Classes	Nom	EE-IE	IE-LE	LE-L1
TGF-beta		<i>Dpp2</i>	↓	-	-
		<i>Dpp3</i>	↓	-	-
		<i>Gbb</i>	-	↓	-
		<i>Myo2</i>	-	↓	-
		<i>Mad2</i>	↓	↓	-
WNT		<i>wg/Wnt1</i>	-	↓	-
		<i>Wnt5</i>	-	↓	-
		<i>Wnt7</i>	-	↓	↗
		<i>WntA</i>	-	↓	-
		<i>tz2</i>	-	↓	-
		<i>axin</i>	-	-	↗
Notch		<i>Di</i>	-	↓	-
		<i>Ser</i>	-	↓	-
		<i>N</i>	-	↓	-
		<i>Su(H)-1</i>	-	↓	-
EGF		<i>Krn</i>	↗	-	-
		<i>EGFR</i>	-	↓	-
		<i>Rho5</i>	-	↗	-
		<i>Star</i>	-	-	↓
		<i>argos1</i>	-	↓	-
		<i>kek 4</i>	-	↗	-
FGF		<i>pnt</i>	-	-	↓
		<i>FGF1</i>	↗	-	-
		<i>FGF8-like</i>	-	↓	-
		<i>FGFR2</i>	-	-	↓
JAK / STAT		<i>Dome3</i>	-	↗	↓
		<i>Dome4</i>	-	↗	-
		<i>STAT2</i>	-	-	↓
Hh		<i>Hh</i>	-	-	↗
		<i>ci</i>	-	↓	↗
NR		<i>USP</i>	-	-	↓
		<i>til</i>	-	↓	-

Parmi les 95 gènes contenant une homéobox et les 101 gènes appartenant à des voies de signalisation présentes dans le génome d'*A. pisum* (Shigenobu, *et al.*, 2010), 27 et 32 gènes respectivement sont identifiés comme différentiellement exprimés dans au moins une des trois comparaisons (Tableau 5. **A et B**). On remarque que, pour ces deux classes, les gènes variant significativement d'expression montrent majoritairement une diminution d'expression, en particulier pour la comparaison IE-LE comme cela a été observé pour l'analyse de l'ensemble des gènes du développement.



**Figure 54. Intensité moyenne d'expression des gènes variant significativement dans au moins une des trois comparaisons réalisées.**

Sont indiqués : en orange, les gènes contenant une homéobox ; en violet, les gènes appartenant à des voies de signalisation et, en vert, les autres gènes variant significativement au cours du développement. L'intensité moyenne d'expression (moyenne  $\pm$  SE) est exprimée en log2.


Si l'on compare l'intensité d'expression moyenne des gènes variant significativement dans au moins une comparaison pour les deux classes de gènes précédemment décrites et pour les autres gènes variant significativement, on observe une diminution globale du niveau d'expression au cours du développement. On constate également une plus forte diminution du niveau d'expression pour les gènes contenant une homéobox.

**Tableau 6. Gènes variant significativement d'expression dans notre jeu de données et appartenant à des cascades d'activation génique se succédant dans le développement des animaux métazoaires.**

Les flèches bleues indiquent une diminution du niveau d'expression ; les flèches rouges, une augmentation et, les tirets noirs, l'absence de variation significative au cours du développement de l'insecte.

Nom	EE-IE	IE-LE	LE-L1
<b>1. Formation des axes corporels</b>			
Tslr	-	-	↗
<b>2. Gènes de segmentation</b>			
Knrl-1	-	↘	↗
til	-	↘	-
Ems	-	↘	-
run	↘	↘	-
ftz	↘	-	-
En	-	↘	-
wg	-	↘	-
ci	-	↘	↗
Hh	-	-	↗
Gsb	-	↘	-
<b>3. Gènes homéotiques</b>			
ftz	↘	-	-
Ubx	-	↘	↗
<b>4. Différenciation des lignées germinales</b>			
vas3	↘	-	-
<b>5. Neurogenèse</b>			
N	-	↘	-
DI	-	↘	-
<b>6. Développement des yeux</b>			
so	-	-	↗
lz	-	-	↘

Activation  
dans  
le temps



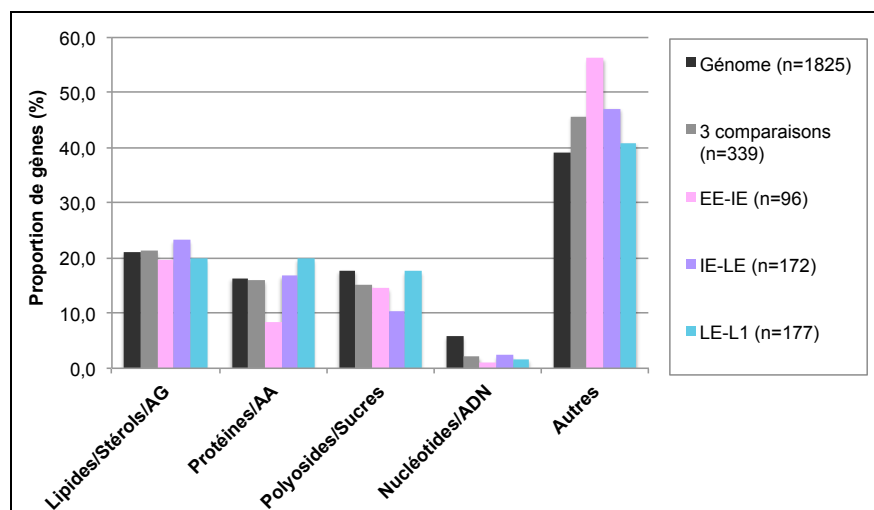
Nous nous sommes également intéressés aux 80 gènes caractérisant le développement embryonnaire précoce (gènes de formation des axes corporels, gènes de segmentation et gènes homéotiques) ainsi que la différenciation (des lignées germinales, du tissu nerveux et des yeux) communs à tous les animaux métazoaires (Tableau 6.) De ces 80 gènes, seulement 17 montrent une expression différentielle dans au moins une comparaison. La totalité des gènes variant d'expression dans les comparaisons EE-IE et IE-LE montre une diminution du niveau d'expression et la majorité d'entre eux appartient à la comparaison IE-LE. Quant à la comparaison LE-L1, la majorité des gènes différentiels voit son expression augmenter au cours du développement.

### 2.3.2 Les gènes du métabolisme

Afin d'explorer les changements métaboliques globaux qui ont lieu pendant le développement parthénogénétique du puceron de pois, nous avons analysé la distribution des gènes différentiellement exprimés au sein des différentes voies métaboliques en utilisant les annotations disponibles dans la base de données AcypiCyc (<http://acypicyc.cycadsys.org/>), qui contient la reconstruction du réseau métabolique du puceron de pois (Vellozo, *et al.*, 2011). Ainsi 96, 172 et 177 gènes différentiellement exprimés sont

impliqués dans 51, 91 et 104 voies métaboliques pour les comparaisons EE-IE, IE-LE et LE-L1 respectivement.

A l'aide des informations présentes dans la base AcypiCyc, nous avons classé toutes ces voies dans cinq larges classes du métabolisme : “lipides / stérols / acides gras”, “protéines / acides aminés”, “polyosides / sucres”, “nucléotides / ADN” et “autres” (Figure 55).



**Figure 55. Répartition des gènes variant significativement d'expression au sein de 5 principales classes métaboliques dans le réseau métabolique du puceron du pois.**

Sont indiqués : En noir, la proportion de gènes pour chaque classe par rapport à l'ensemble des gènes du métabolisme ( $n = 1825$ ) ; en gris, les gènes variant significativement d'expression dans au moins une des 3 comparaisons ( $n = 339$ ) ; en rose, les gènes différentiels pour la comparaison EE-IE ( $n = 96$ ) ; en violet, les gènes différentiels pour la comparaison IE-LE ( $n = 172$ ) ; en bleu, les gènes différentiels pour la comparaison LE-L1 ( $n = 177$ ).

La comparaison de la distribution dans ces classes de l'ensemble des gènes variant significativement d'expression par rapport à l'ensemble des gènes du métabolisme ne révèle globalement aucun changement significatif. Par exemple, 15,9 % des gènes variant d'expression codent pour des enzymes faisant partie du métabolisme des acides aminés, ce pourcentage n'étant pas significativement différent de la fraction des gènes du métabolisme appartenant à cette classe dans le génome du puceron du pois, qui est de 16,4 %. L'analyse des trois comparaisons (EE-IE, IE-LE et LE-L1) séparément montre, en revanche, une plus faible proportion de gènes différentiels impliqués dans le métabolisme des acides aminés et des protéines pour la comparaison EE-IE par rapport aux autres comparaisons (8,3 % de gènes différentiels liés au métabolisme appartiennent à cette classe, contre 19,9 % pour la comparaison LE-L1). Une plus faible proportion de gènes variant d'expression est également observée pour le

métabolisme des sucres et pour la comparaison IE-LE (10,5 % des gènes du métabolisme différentiels pour cette comparaison, contre plus de 14,5 % pour les autres comparaisons).

---

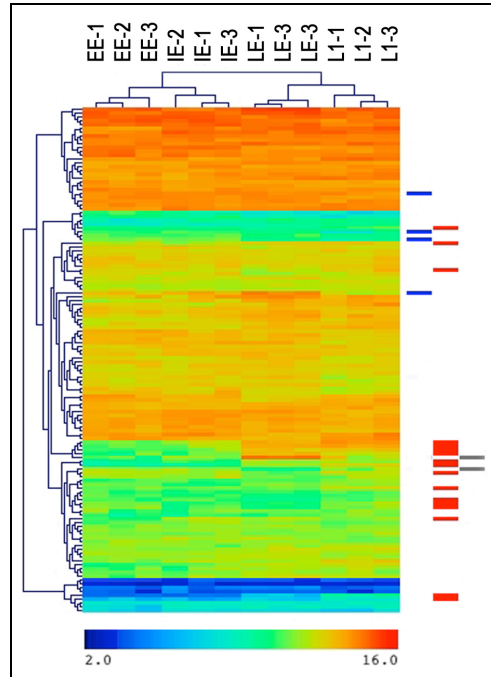
### 2.3.3 Les gènes du métabolisme des acides aminés

De par la base nutritionnelle de la relation symbiotique liant le puceron et *B. aphidicola* et les besoins particuliers en acides aminés pour la croissance et le développement des embryons mis en évidence dans la première partie de mon travail de thèse, l'analyse des données transcriptomiques a été consacrée, pour une part importante, à l'étude du métabolisme des acides aminés. Pour cela, je me suis concentrée sur les 135 gènes annotés comme étant liés à la biosynthèse ou à la dégradation des acides aminés par Wilson et collaborateurs (2010).

#### *2.3.3.1 Identification des voies mobilisées*

Cette analyse a révélé que la majorité des gènes impliqués dans ces voies métaboliques sont fortement exprimés (Figure 56.) : 78,5 % des gènes liés au métabolisme des acides aminés sont classés parmi les 25 % des gènes montrant les plus forts niveaux d'expression dans l'ensemble des nos données.

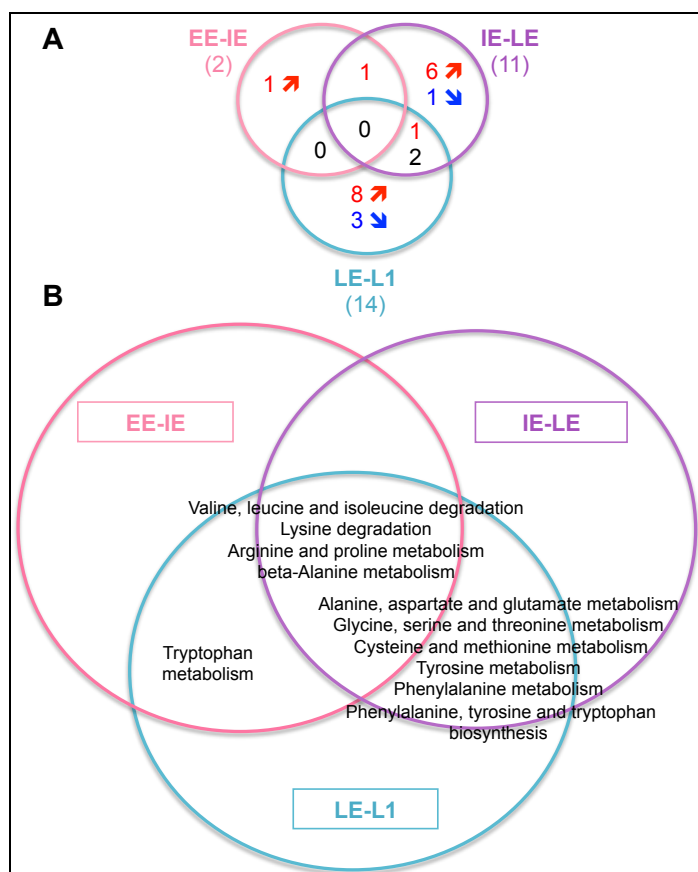




**Figure 56. Analyse de l'expression des gènes liés à la synthèse et à la dégradation des acides aminés chez le puceron de pois.**

Classification hiérarchique non supervisée (logiciel MeV), basée sur la similitude des profils d'expression entre les quatre groupes de stades de développement analysés, des 132 gènes du métabolisme des acides aminés présents sur la puce et annotés par Wilson et collaborateurs (2010). Le nuancier indiquant les intensités d'expression utilise une échelle en logarithmes de base 2. Les couleurs bleu et rouge représentent respectivement les intensités d'expression les plus basses (2.0) et les intensités les plus fortes (16.0). Sont indiqués : en bleu, les gènes dont l'expression diminue dans une ou plusieurs comparaisons ; en rouge, les gènes dont l'expression augmente dans une ou plusieurs comparaisons ; et en noir, les gènes communs à 2 ou 3 comparaisons mais ne variant pas dans le même sens.

Parmi les 135 gènes appartenant à ces voies, 23 ont montré une expression significativement différentielle dans nos comparaisons, avec 17 et 4 gènes dont l'expression augmente ou diminue respectivement dans une ou plusieurs comparaisons et 2 gènes dont l'expression change de sens de variation au cours du développement.



**Figure 57. Répartition des gènes appartenant au métabolisme des acides aminés différentiellement exprimés et vue d'ensemble des voies métaboliques sollicitées dans les trois comparaisons analysées dans cette étude.**

**A)** Diagramme de Venn des 23 gènes du métabolisme des acides aminés différentiellement exprimés dans nos trois comparaisons. Sont indiqués : en noir, les gènes communs à 2 ou 3 comparaisons mais ne variant pas dans le même sens ; en rouge, les gènes dont l'expression augmente dans une ou plusieurs comparaisons et, en bleu, les gènes dont l'expression diminue dans une ou plusieurs comparaisons.

**B)** Répartition des voies du métabolisme des acides aminés comprenant des gènes variant significativement d'expression dans au moins l'une des trois comparaisons.

Le nombre de gènes différentiellement exprimés liés au métabolisme des acides aminés est de 2, 11 et 14 respectivement dans les comparaisons EE-IE, IE-LE et LE-L1 (Figure 57.A). En considérant le nombre de gènes variant d'expression ainsi que leur sens de variation par comparaison, les résultats montrent une activation des gènes du métabolisme des acides aminés dans les stades les plus avancés.

Chaque gène code pour une activité enzymatique qui peut être impliquée dans une ou plusieurs voies métaboliques, comme il apparaît de l'analyse des cartes disponibles dans la base des données KEGG (Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes : <http://www.genome.jp/kegg/>). Les

voies métaboliques (ou cartes KEGG) comportant des gènes significatifs dans une ou plusieurs comparaisons sont indiquées dans la Figure 57.B. Cette répartition est différente de celle des gènes en raison de la possible implication d'un gène dans différentes voies.

A partir de la classification des gènes du métabolisme des acides aminés au sein des familles biosynthétiques et de dégradation des acides aminés établie par Wilson et collaborateurs (2010) pour le puceron du pois, nous avons évalué la répartition de nos gènes différenciellement exprimés au sein de ces familles (Tableau 7) (cf détails en Annexes : **Tableau S2**).

**Tableau 7. Répartition des gènes différenciellement exprimés dans l'ensemble de nos données parmi les différentes familles biosynthétiques ou de dégradation des acides aminés.**

**A)** Les familles biosynthétiques des acides aminés classées en fonction du principal précurseur utilisé.

**B)** Les familles de dégradation des acides aminés classées en fonction du principal produit terminal engendré.

**A)**

Famille biosynthétique des acides aminés (précurseur principal)	Acides aminés impliqués	Nombre de gènes annotés	Nombre de gènes différentiels (% des gènes annotés)
Oxaloacétate	acide aspartique, asparagine, méthionine, cystéine, thréonine, isoleucine, lysine	22	3 (14 %)
Phosphoénolpyruvate	phénylalanine, tyrosine, tryptophane	6	2 (33 %)
$\alpha$ -cétoglutarate	acide glutamique, glutamine, proline, arginine	27	4 (15 %)
3-phosphoglycérate	sérine, cystéine, glycine	26	9 (35 %)
Ribose-5-phosphate	histidine	0	0 (-)
Pyruvate	alanine, leucine, valine	1	0 (0 %)

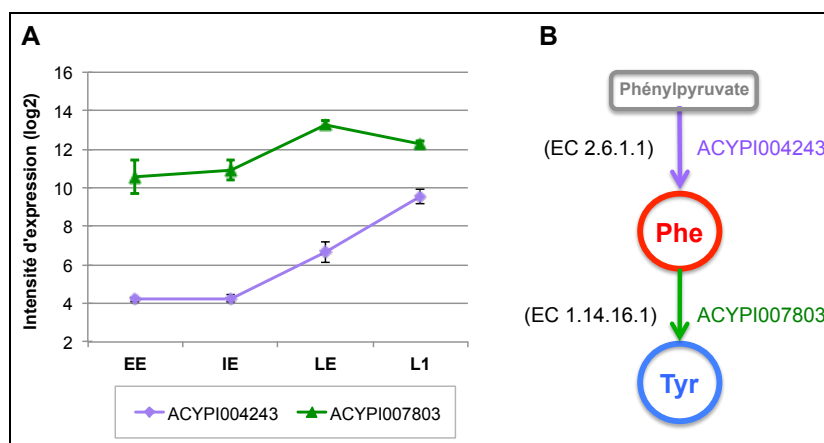
**B)**

Famille de dégradation des acides aminés (produit terminal principal)	Acides aminés impliqués	Nombre de gènes annotés	Nombre de gène différentiels (% des gènes annotés)
$\alpha$ -cétoglutarate	arginine, glutamine, acide glutamique, histidine, proline	28	3 (11 %)
Succinyl-CoA	isoleucine, méthionine, thréonine, valine	25	2 (8 %)
Oxaloacétate	acide aspartique, asparagine	18	8 (44 %)
Pyruvate	alanine, cystéine, glycine, sérine	10	1 (10 %)
Acétyl-CoA et acétoacétyl-CoA	isoleucine, leucine, lysine, phénylalanine, tryptophane, tyrosine	41	6 (15 %)

On constate que les gènes variant d'expression au cours du développement du puceron du pois sont faiblement représentés dans ces classes. Trois familles présentent toutefois une proportion plus élevée de gènes différentiels. Il s'agit de la famille dont la biosynthèse d'acides aminés se réalise à partir de phosphoénolpyruvate, comme cela est le cas pour la synthèse de la phénylalanine, de la tyrosine et du tryptophane. Cette famille présente, en effet, 2 gènes différentiels sur 6. On notera également les 35 % de gènes différentiels pour la famille biosynthétique d'acides aminés (sérine, cystéine, glycine) utilisant le 3-phosphoglycérate comme principal précurseur. La dernière famille présentant plus de gènes variant d'expression concerne la dégradation de l'acide aspartique et de l'asparagine.

#### *2.3.3.2 La voie de la tyrosine*

La voie du métabolisme de la tyrosine (Tyr) nous est apparue comme particulièrement intéressante. En effet, les deux seules activités enzymatiques codées dans le génome de puceron pour cette voie (EC 2.6.1.1 et 1.14.16.1) sont sollicitées pendant le développement avec les deux gènes correspondants (ACYPI004243 et ACYPI007803) variant significativement d'expression au cours du développement de l'insecte (Figure 58). Il est à remarquer que ces changements d'expression ont été confirmés par nos expériences de RT-PCR en temps réel (cf §2.5.2 p 176).



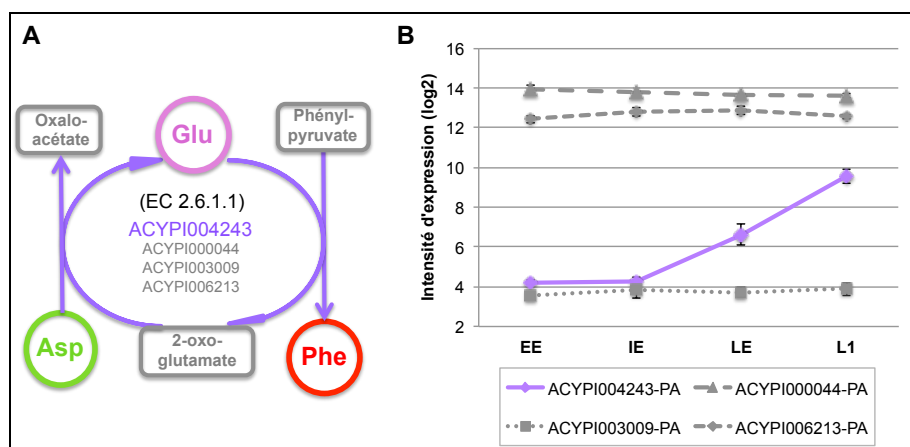
**Figure 58. Gènes variant significativement d'expression au cours du développement du puceron du pois dans la voie de biosynthèse de la phénylalanine et de la tyrosine.**

**A)** Suivi de l'intensité d'expression (moyenne des 3 réplicats biologiques  $\pm$  SE) des deux gènes de cette voie variant significativement d'expression au cours du développement. Sont indiqués : en violet, le gène ACYPI004243 et, en vert, le gène ACYPI007803. Les intensités d'expression de ces deux gènes sont exprimées en log2.

**B)** Le gène ACYPI004243 code pour l'activité enzymatique 2.6.1.1, catalysant la dernière étape de la biosynthèse de la phénylalanine et le gène ACYPI007803 code pour l'activité enzymatique 1.14.16.1 responsable de la biosynthèse de la tyrosine.

Le gène ACYPI004243 code pour l'aspartate transaminase, activité enzymatique responsable de la dernière étape de la synthèse de la phénylalanine chez le puceron du pois (EC 2.6.1.1). Le niveau d'expression de ce gène est relativement bas dans le groupe des embryons précoces (EE) et intermédiaires (IE) comparativement à d'autres gènes, mais augmente significativement dans le passage aux stades LE et L1 (différentiel d'expression en échelle log2 de 2.37 et 2.91 pour les comparaisons IE-LE et LE-L1 respectivement).

Trois autres gènes dans le génome du puceron du pois (ACYPI003009, ACYPI000044 et ACYPI006213) codent pour l'aspartate transaminase (Figure 59A). Les profils transcriptomiques distincts pour ces trois gènes sont présentés dans la Figure 59B: les gènes ACYPI000044 et ACYPI006213 montrent un niveau d'expression élevé et constant pendant le développement, tandis que l'expression du gène ACYPI003009 est constant mais très bas pendant le développement.



**Figure 59. Gènes codant pour l'aspartate transaminase dans le génome du puceron du pois.**

**A)** La réaction de transamination, réalisée par l'activité enzymatique EC 2.6.1.1, permet la synthèse d'acide glutamique et de phénylalanine.

**B)** Suivi de l'intensité d'expression (moyenne des 3 réplicats biologiques  $\pm$  SE) des quatre gènes codant cette activité enzymatique au cours du développement du puceron du pois.

Sont indiqués : en violet, le gène ACYPI004243 et, en gris, les trois autres gènes (ACYPI000044, ACYPI003009, ACYPI006213) codant cette activité enzymatique mais ne variant pas significativement d'expression au cours du développement du puceron. Les intensités d'expression sont exprimées en log2.

L'augmentation des niveaux d'expression des gènes codant les enzymes de la voie de la tyrosine dans les stades de développement les plus avancés chez le puceron du pois est à considérer à la lumière des données d'HPLC obtenues dans la première partie de ma thèse, montrant une accumulation de l'acide aminé tyrosine dans le groupe embryonnaire LE et le stade larvaire L1. Ces deux résultats m'ont incitée à réaliser une analyse plus détaillée des 4 gènes (ACY004243, ACYPI003009, ACYPI000044 et ACYPI006213) annotés dans la base de données AcypiCyc comme codant l'aspartate transaminase 2.6.1.1. Cette analyse a été réalisée grâce à la méthode PRIAM (Enzyme-specific profiles for genome annotation) qui permet, dans un génome complet, l'identification de tous les gènes codant des activités enzymatiques (Claudel-Renard, *et al.*, 2003). Bien que l'annotation primaire de PRIAM pour les 4 gènes désigne l'aspartate transaminase 2.6.1.1, deux autres annotations ressortent de cette analyse et indiquent les activités enzymatiques tyrosine transaminase (EC 2.6.1.5) et acide aminé aromatique transaminase (EC 2.6.1.57). Cette analyse confirme l'hypothèse du rôle de ces quatre gènes dans les réactions catalysant la transamination de l'aspartate, la tyrosine et les acides aminés aromatiques.

Le gène ACYPI007803 code pour la phénylalanine-4-monooxygénase responsable de la synthèse de la tyrosine chez le puceron du pois (EC 1.14.16.1) : l'expression de ce gène augmente

significativement dans la comparaison IE-LE (différentiel d'expression en échelle  $\log_2 = 3,36$ ). Trois autres gènes ont été annotés comme codant potentiellement pour cette activité enzymatique dans le génome du puceron du pois : les gènes ACYPI000847, ACYPI008168 et ACYPI000175. Les gènes ACYPI000847 et ACYPI008168 sont annotés dans l'analyse AcypiCyc avec des scores plus favorables pour les activités 4.2.1.96 (4 $\alpha$ -hydroxy-tétrahydroptérine déhydratase) et 1.14.16.2 (tyrosine 3-monooxygénase) respectivement. Seul le gène ACYPI008168 apparaît comme significativement variant lors de nos analyses et montre une augmentation d'expression pour la comparaison IE-LE ( $\log_2$  différentiel d'expression = 5,34), puis une diminution d'expression pour la comparaison LE-L1 ( $\log_2$  différentiel d'expression = -1,59). Le gène ACYPI000175, quant à lui, montre un score d'annotation faible pour l'activité 1.14.16.1 dans AcypiCyc et il n'a pas montré de changement significatif d'expression.

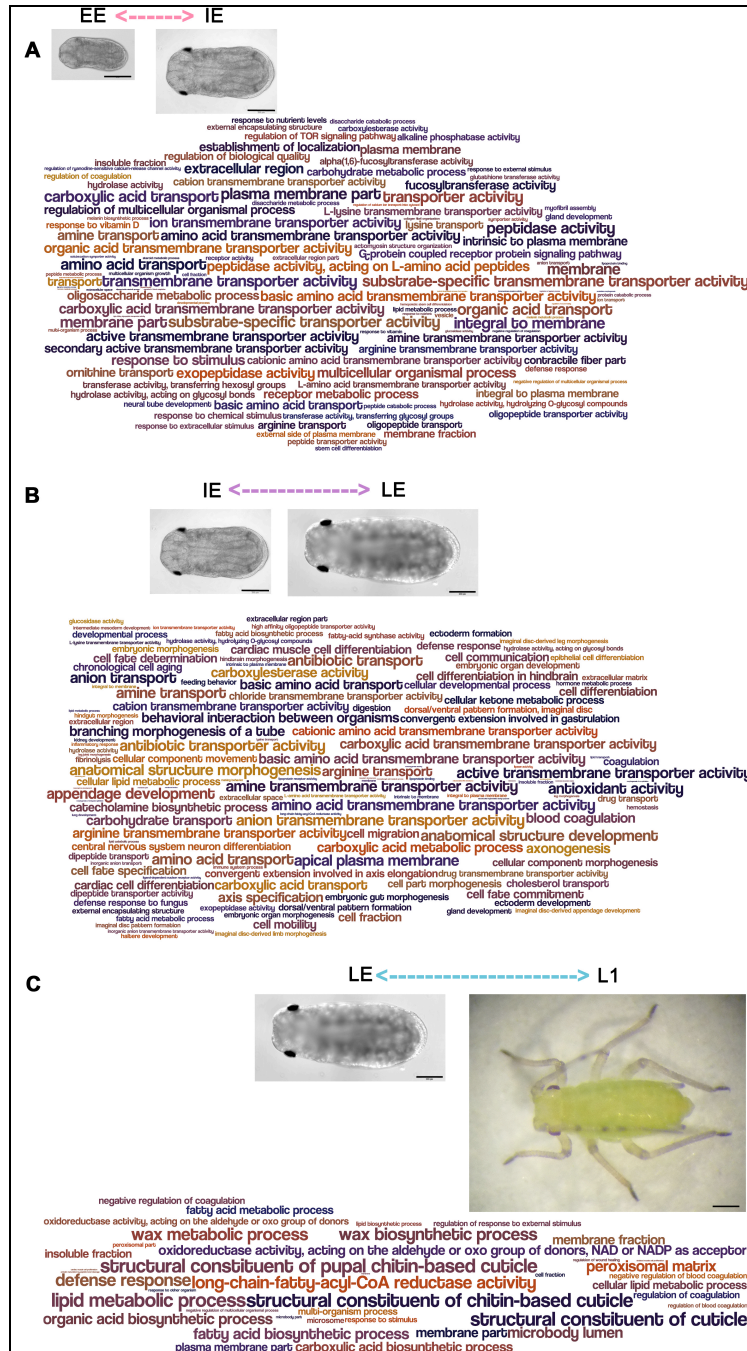
---

## 2.4 Enrichissement des classes fonctionnelles de gènes

Afin de déterminer si des classes fonctionnelles de gènes sont plus touchées que d'autres par les changements d'expression retrouvés au cours du développement du puceron du pois, nous avons réalisé, pour chacune des comparaisons étudiées dans cette étude, une analyse d'enrichissement des classes fonctionnelles de gènes basées sur leur ontologie (analyse GO). Cette analyse a été réalisée en utilisant la méthode GOSSIP (Bluthgen, *et al.*, 2005) qui compare une liste de gènes d'intérêt (nos gènes différentiels ayant une annotation GO) à une liste de gènes de référence (ensemble des gènes ayant une annotation GO). Or, l'annotation du génome du puceron du pois étant très récente (IAGC, 2010), parmi les 23 855 gènes présents sur la puce à ADN, seuls 10 823 gènes ont une annotation GO, et cette liste de 10 823 gènes constitue notre liste de référence. Les listes de gènes d'intérêts comprennent respectivement 680, 944 et 1096 gènes différentiellement exprimés et ayant une annotation GO sur les 1264, 1654 et 2251 gènes significatifs retrouvés respectivement dans les comparaisons EE-IE, IE-LE et LE-L1.

Cette analyse révèle pour les comparaisons EE-IE, IE-LE et LE-L1 respectivement 246, 274 et 94 classes fonctionnelles enrichies, avec le plus grand nombre de classes GO enrichies pour les deux premières comparaisons impliquant uniquement les stades embryonnaires. À l'aide du logiciel Wordle, nous avons produit une vue globale de la première moitié des classes GO enrichies (classées en fonction de leur valeur de  $P$ ) afin de

mettre en évidence les résultats les plus significatifs de notre étude (Figure 60).



**Figure 60. Représentation de la première moitié des classes fonctionnelles de gènes enrichies en gènes différentiels pour les trois comparaisons EE-IE, IE-LE et LE-L1.**

Les représentations des classes enrichies ont été réalisées à l'aide du logiciel Wordle (<http://www.wordle.net/>) permettant d'attribuer une taille de caractère aux différents niveaux d'enrichissement. Nous avons arbitrairement choisi de sélectionner la première moitié des classes fonctionnelles enrichies ayant les plus faibles valeurs de P et de faire évoluer la taille des caractères toutes les 10 classes.



Cette analyse globale montre un enrichissement en classes fonctionnelles de gènes liés au transport pour les comparaisons EE-IE et IE-LE, avec la présence de transporteurs d'acides aminés parmi les classes les plus significatives (Figure 60 A et B). Pour la comparaison IE-LE, les gènes liés à la morphogenèse et au développement des appendices montrent des changements significatifs de leur niveau d'expression (Figure 60B). Pour les comparaisons IE-LE et LE-L1, l'analyse révèle trois classes de gènes toutes en relation avec le processus de formation de la cuticule (Figure 60 B et C).

---

#### 2.4.1 Les gènes du transport d'acides aminés

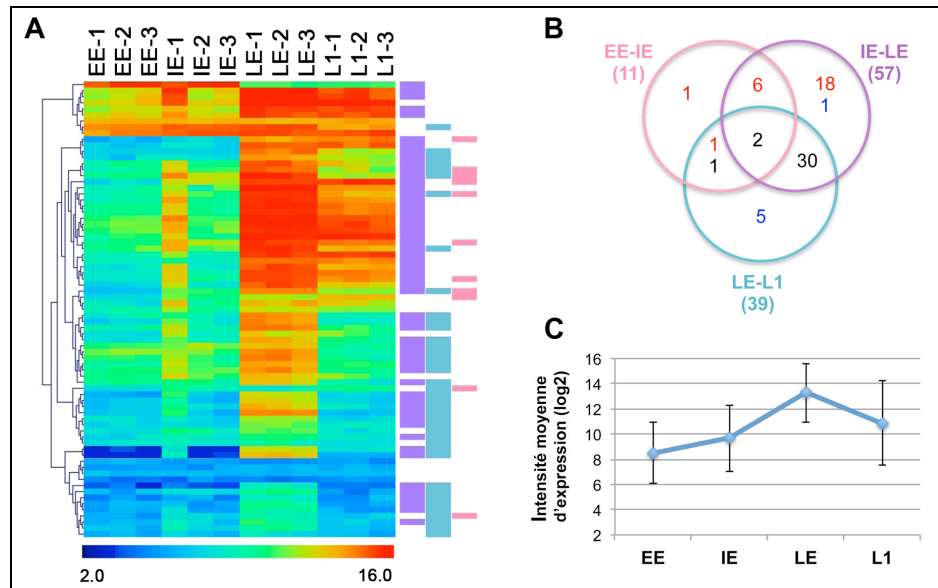
L'analyse précédente ayant montré que les classes de gènes impliqués dans des fonctions de transport d'acides aminés présentaient de nombreux gènes variant d'expression, nous avons analysé en détail la fonction de ces gènes en étudiant les gènes annotés récemment par Price et collaborateurs (2011) comme représentant l'ensemble de ces transporteurs présents dans le génome du puceron du pois. Parmi les 40 transporteurs d'acides aminés et les 6 transporteurs de sodium, potassium et chlore annotés par Price et collaborateurs, respectivement 28 et 4 gènes sont présents sur la puce « ACYPI v1.0 ». Les 32 gènes représentés sur la puce à ADN sont détectés comme exprimés dans tous les échantillons analysés. En outre, comme montré par l'analyse d'enrichissement des classes GO (Figure 60), la majorité (20 des 32) des gènes codant pour des transporteurs est présente parmi les gènes significatifs dans au moins l'une des trois comparaisons (cf Annexes : **Tableau S3**). Parmi les 13 gènes (présents sur la puce) appartenant à la famille AAAP (*amino acid/auxin permease family*), 6 gènes varient d'expression au cours du développement : 4 gènes diminuent d'expression (comparaisons IE-LE et/ou LE-L1), et 2 gènes augmentent d'expression dans les phases plus précoces du développement (comparaisons EE-IE et IE-LE). Quant à la famille de gènes APC (*amino acid/polyamine/organocation transporters*), 11 des 15 gènes présents sur la puce montrent des changements significatifs de leur niveau d'expression pendant le développement. Dix de ces gènes codant des transporteurs APC montrent des niveaux d'expression croissants pendant le développement (majoritairement lors des comparaisons EE-IE et IE-LE), tandis qu'un seul gène diminue d'expression et ceci pour la comparaison LE-L1. Quant aux transporteurs de sodium, potassium et chlore, nécessaires pour créer le gradient utilisé par les transporteurs APC et AAAP, 3 des 4 gènes représentés sur la puce « ACYPI v1.0 » montrent des changements

significatifs d'expression : deux gènes augmentent puis diminuent d'expression pendant le développement et le troisième gène diminue d'expression au stade LE en comparaison au stade IE.

---

#### 2.4.2 Les gènes liés formation de la cuticule

L'analyse GO pour les comparaisons IE-LE et LE-L1 a montré que trois classes liées à la formation de la cuticule sont particulièrement sollicitées : la classe GO:0042302 (constituants structuraux de la cuticule), la classe GO:0005214 (constituants structuraux de la cuticule basés sur la chitine) et la classe GO:0008011 (constituants structuraux cuticulaires de la puppe basés sur la chitine). Ces trois classes correspondent en effet à trois niveaux successifs de classes GO. Nous avons donc analysé les 75 gènes appartenant à la plus haute des classes GO ressortissant de notre analyse (GO:0042302), qui représente l'ensemble des gènes de chacune des trois classes.



**Figure 61. Analyse de l'expression des gènes liés aux constituants structuraux de la cuticule (classe GO:0042302) chez le puceron de pois.**

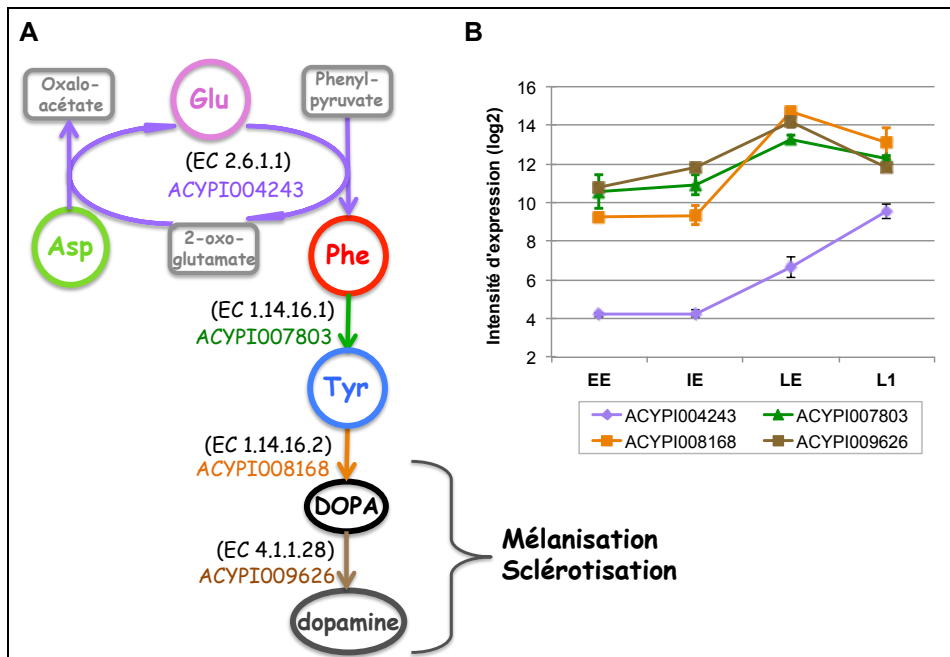
**A)** Classification hiérarchique non supervisée (logiciel MeV) des 75 gènes liés aux constituants de la cuticule, basée sur la similitude des profils d'expression entre les quatre groupes de stades de développement analysés. Le nuancier indiquant les intensités d'expression utilise une échelle en logarithmes de base 2. Les couleurs bleu et rouge représentent respectivement les intensités d'expression les plus basses (2.0) et les intensités les plus fortes (16.0). Sont indiqués respectivement : en violet, en turquoise et en rose, les gènes variants significativement d'expression pour les comparaisons EE-IE, IE-LE et LE-L1.

**B)** Diagramme de Venn des 65 gènes différentiellement exprimés dans nos trois comparaisons. Sont indiqués : en noir, les gènes communs à 2 ou 3 comparaisons mais ne variant pas dans le même sens ; en rouge, les gènes dont l'expression augmente dans une ou plusieurs comparaisons et, en bleu, les gènes dont l'expression diminue dans une ou plusieurs comparaisons.

**C)** Suivi de l'intensité (log<sub>2</sub>) d'expression moyenne au cours du développement des 65 gènes différentiels.

La majorité (65 sur 75) des gènes appartenant à cette classe GO, montre un changement significatif du niveau d'expression dans au moins une comparaison (Figure 61.A) (cf Annexes : **Tableau S4**). Cinquante-six de ces 65 gènes (= 86 %) présentent une augmentation d'expression entre le stade IE et le stade LE (Figure 61.B). Trente-sept de ces 65 gènes ont un niveau d'expression significativement inférieur pour le stade larvaire L1 en comparaison au stade embryonnaire LE. Ainsi, le profil global d'expression des gènes significativement variants montre une nette augmentation en fin de développement embryonnaire (comparaison IE-LE), puis une diminution de l'expression des gènes cuticulaires après la ponte de l'embryon (comparaison LE-L1) (Figure 61.C).

L'analyse GO ayant clairement montré la forte implication des gènes impliqués dans la formation de la cuticule et de la tyrosine (précurseur nécessaire à la mélanisation et à la sclérotisation de la cuticule), dont la proportion augmente dans les stades de développement les plus avancés (cf Résultats, § 1.2 p 130), nous avons analysé dans le détail cette voie.



**Figure 62. Ensemble des réactions conduisant à la production de DOPA et de dopamine chez le puceron du pois et gènes différentiels associés.**

**A)** Voie de synthèse de la DOPA et de la dopamine et gènes différentiels appartenant à cette voie chez le puceron du pois.

**B)** Suivi de l'intensité d'expression (moyenne des 3 réplicats biologiques  $\pm$  SE) des quatre gènes différentiels impliqués dans cette voie au cours du développement. L'intensité d'expression des gènes est exprimée en  $\log_2$ .

L'analyse des profils d'expression des gènes codant les 2 enzymes impliquées dans la synthèse de la DOPA et de la dopamine nous a permis de mettre en évidence deux gènes (ACYPI008168 et ACYPI009626) différemment exprimés dans au moins une comparaison.

L'expression du gène ACYPI008168 qui code pour la tyrosine 3-monooxygénase (EC 1.14.16.2), catalysant la synthèse de DOPA à partir de la tyrosine, montre une hausse significative entre le stade IE et LE puis une diminution significative au stade L1 (Figure 62B). Chez le puceron du pois, plusieurs gènes ont été annotés, grâce à la base AcypiCyc, comme codant l'enzyme DOPA décarboxylase (EC 4.1.1.28). Parmi ceux-ci, le gène ACYPI009626, dont l'expression augmente significativement pour la comparaison IE-LE puis diminue significativement pour la comparaison

LE-L1, a reçu le score d'annotation le plus élevé (Vellozo, *et al.*, 2011). Les 6 autres gènes ont été annotés comme codant pour l'enzyme la EC 4.1.1.28 avec un score inférieur (Vellozo, *et al.*, 2011) : 5 d'entre eux n'ont pas montré de changements de leur niveau d'expression pendant le développement, tandis que le dernier gène (ACYPI003325) présente une réduction d'expression pour la comparaison LE-L1.

La prise en compte de l'ensemble de ces données montre une activation des voies métaboliques menant à la synthèse des protéines cuticulaires (riches en tyrosine) et des précurseurs nécessaires au processus de mélanisation et sclérotisation de la cuticule dans les étapes tardives du développement embryonnaire du puceron de pois (Figure 61 et Figure 62).

---

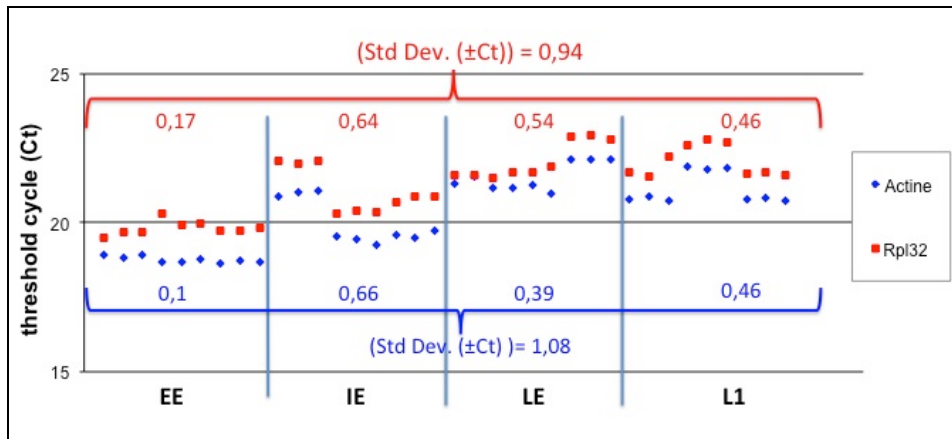
## 2.5 Validation des données de puces par RT-PCR en temps réel

Afin de valider les données obtenues lors des expériences de puces à ADN, nous avons répété l'expérience sur les 4 mêmes groupes de stades de développement (EE, IE, LE, L1) et avons évalué quantitativement l'expression de 8 gènes d'intérêt par RT-PCR en temps réel (qRT-PCR). Cette validation a été conduite sur 3 nouveaux échantillons biologiques par stade (cf Matériel et Méthodes § 3.6.3.1 p 114).

---

### 2.5.1 Choix du gène de normalisation

Lors d'expériences de RT-PCR en temps réel, il est important de pouvoir s'affranchir de biais introduits lors des étapes de préparation des échantillons ou encore spécifiques à certaines des conditions expérimentales testées. Pour cela, les valeurs d'expression de nos gènes d'intérêt doivent être corrigées en se basant sur les données d'expression d'un gène de normalisation. Ne pouvant savoir *a priori* quel gène aura un niveau d'expression invariant pour l'ensemble des conditions expérimentales, nous avons tout d'abord procédé à la quantification de l'expression de deux gènes candidats [ACYPI000074 (Rpl32) et ACYPI000064 (actine)] et avons quantifié les variations de leurs niveaux d'expression entre les différentes conditions expérimentales testées dans cette étude (Figure 63).



**Figure 63.** Comparaison des variations du niveau d'expression de deux gènes candidats à la normalisation des données de qRT-PCR pour chacun des stades étudiés.

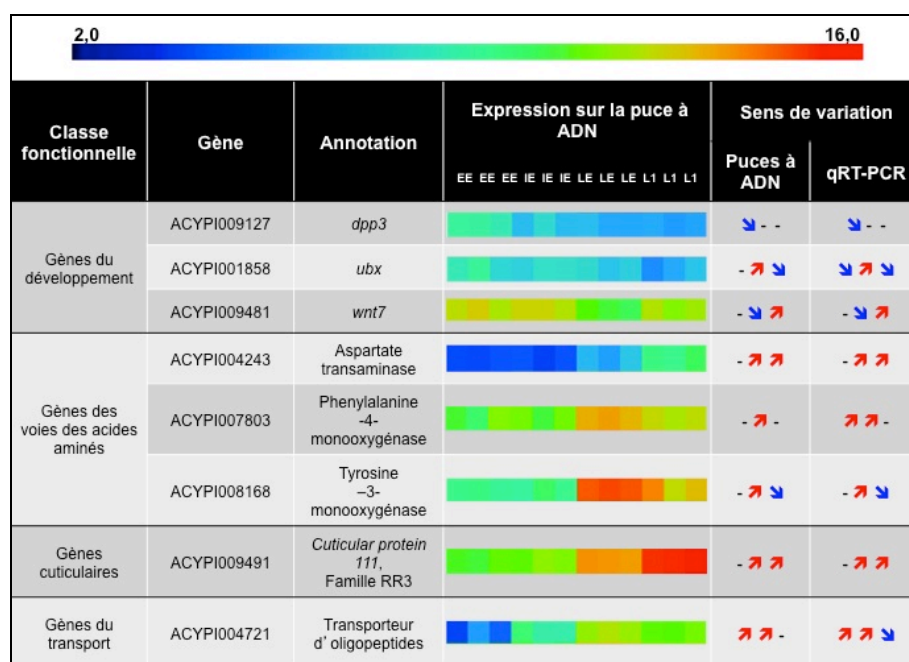
Les écarts-type (Std Dev.) des Ct (correspondant aux nombres fractionnaires de cycles pour lequel l'intensité de la fluorescence émise a dépassé une valeur seuil significativement différente du bruit de fond dans une réaction de RT-PCR quantitative) sont calculés pour chaque stade et pour l'ensemble des échantillons par le logiciel BestKeeper. Les deux gènes testés sont le gène codant l'actine (ACYPI000064) et celui codant la protéine ribosomale L32 (ACYPI000074).

A l'aide du logiciel BestKeeper, nous avons comparé les variations d'expression des deux gènes candidats (Actine et Rpl32) pour chacun des stades étudiés et pour l'ensemble des stades. Les variations du niveau d'expression pour l'ensemble des stades et des répétitions sont très proches entre les deux gènes avec toutefois une plus faible déviation standard observée pour le gène Rpl32 (0,94 contre 1,08 pour le gène de l'actine). Les comparaisons des niveaux d'expression au sein de chaque répétition par stade montrent que les variations observées pour les deux gènes sont également très proches, avec la plus grande différence entre les gènes observée pour le stade embryonnaire LE (Rpl32 = 0,54 et actine = 0,39).

Les deux gènes montrent d'excellents résultats avec peu de variation du niveau d'expression, notre choix s'est porté sur le gène codant l'actine (ACYPI000064) car celui-ci présente une variation plus faible au sein de chaque stade. Ce point est en effet important si l'on veut comparer les stades deux à deux comme nous l'avons fait pour les données de puces à ADN.

### 2.5.2 Comparaison du niveau d'expression entre les deux méthodes d'analyse

Une synthèse des résultats de RT-PCR quantitative et leur comparaison avec les données obtenues par puces à ADN est présentée dans la Figure 64.



**Figure 64. Confirmation des données des puces à ADN par des expériences de qRT-PCR.**

L'analyse a été réalisée sur 8 gènes appartenant à 4 classes d'intérêt. Les sens de variation des gènes obtenus avec les deux méthodes sont ici comparés.

Pour 21 des 24 comparaisons réalisées (3 comparaisons pour chacun des 8 gènes) les résultats issus de l'analyse transcriptomique et de la RT-PCR en temps réel montrent que les gènes analysés varient dans le même sens. Pour les 3 comparaisons restantes, les sens de variation sont concordants, mais la limite de significativité n'est pas dépassée pour l'une des méthodes d'analyse.

Cette analyse nous permet de confirmer les résultats obtenus par notre approche de puces à ADN. Cette confirmation est d'autant plus robuste que les échantillons ayant servi à la réalisation des deux expériences ont été préparés de façon indépendante. Enfin, nos résultats de RT-PCR en temps réel nous permettent de valider la méthode d'amplification des ARNm que nous avons dû utiliser pour la préparation

des cibles fluorescentes à hybrider sur la puce (cf Matériels et Méthodes §3.3.2 p 101).

---

## 2.6 Discussion

L'étude métabolique, réalisée dans ma première partie de thèse, a mis en évidence des voies clé du métabolisme des acides aminés lors du développement embryonnaire et larvaire du puceron du pois et je me suis alors intéressée aux gènes pouvant réguler ces voies mais également d'autres fonctions biologiques. Grâce à la puce à ADN « ACYPI v1.0 » développée dans notre unité et contenant 23 855 gènes du puceron du pois, nous avons réalisé la première analyse globale du transcriptome de cet insecte et ceci à des stades clé de son développement. Pour cela, nous avons suivi les profils d'expression des gènes au cours du développement en réalisant trois comparaisons : 1) embryons précoces (EE) contre embryons intermédiaires (IE) ; 2) embryons intermédiaires contre embryons tardifs (LE) et 3) embryons tardifs contre premier stade larvaire (larves de stade L1 âgées de 0-24h).

L'analyse globale du transcriptome a permis de mettre en évidence 3945 gènes différentiellement exprimés (16 % du nombre total de gènes présents sur la puce) au cours du développement. Les trois comparaisons réalisées ont montré une augmentation du nombre de gènes variant d'expression au cours du développement. C'est en particulier dans la comparaison entre les embryons tardifs et le premier stade larvaire (LE-L1) qu'on retrouve le plus grand nombre de gènes différentiels (2251 gènes). Cette observation est relativement peu surprenante compte tenu des groupes de stades comparés. En effet, chez les embryons, même tardifs, des étapes importantes du processus de morphogenèse sont encore en cours, alors qu'elles sont entièrement terminées chez la larve. De plus, il est aisé d'envisager que les embryons se développant dans la femelle parthénogénétique présentent un métabolisme différent des larves nouvellement pondues, qui commencent à se nourrir sur la plante. Ce changement est d'autant plus souligné par la mise en évidence de 404 gènes différentiels en commun entre les comparaisons IE-LE et LE-L1, mais dont le sens de variation est opposé entre les deux comparaisons. Ces gènes représentent ainsi des gènes clé pour le passage de la vie embryonnaire à la vie larvaire. Si l'on s'intéresse au sens de variation de l'expression de ces gènes, on remarque également que 73 % d'entre eux voient leur expression augmenter au stade LE puis diminuer au stade L1. De plus, au cours du développement, nous avons mis en évidence, parmi les gènes différentiels, une augmentation de la proportion de gènes dont l'expression diminue.



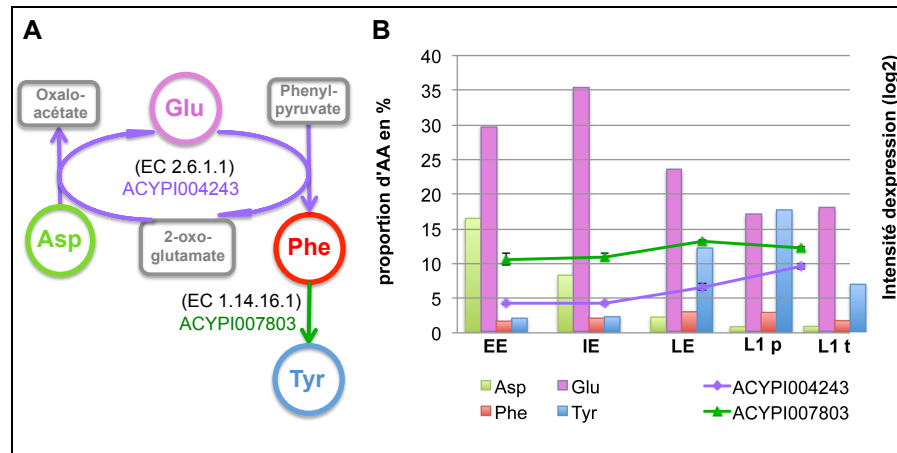
Comme attendu, de nombreux gènes nécessaires pour le développement embryonnaire sont finalement réprimés avec le début de la vie larvaire.

Nous nous sommes ensuite intéressée aux différentes fonctions que pouvaient avoir ces gènes différentiels. Notre analyse a tout naturellement débuté avec les gènes du développement. Parmi les 370 gènes présents sur la puce « ACYPI v1.0 » et ayant été annotés comme appartenant à la grande classe des gènes du développement (Shigenobu, *et al.*, 2010), 32 % sont significativement variant dans au moins l'une des trois comparaisons réalisées. Nous avons également observé que près de 70 % de ces gènes différentiels montrent une diminution d'expression au cours du développement et cela principalement dans le passage du stade IE au stade LE. Cette proportion est respectée quelque soit la classe de gènes analysée (gènes contenant une homéobox, gènes appartenant à des voies de signalisation et les autres gènes du développement). Toutefois, l'intensité d'expression moyenne des gènes appartenant à la superfamille des gènes contenant une homéobox est plus fortement réduite au stade LE que pour les autres classes. Ces gènes sont connus pour être des régulateurs de la transcription capables de contrôler des cascades d'activation génique, dont certaines sont importantes dans le développement et la morphogenèse précoces de tous les métazoaires (Adryan, *et al.*, 2010 ; Christensen, *et al.*, 2008). La forte diminution du niveau d'expression de ces gènes dans le passage aux stades embryonnaires tardifs nous permet d'émettre l'hypothèse que chez le puceron du pois, comme observé dans d'autres modèles insectes, les grandes cascades d'activation génique contrôlées par les homéobox sont mises en route dans les stades précoces du développement embryonnaire et de la morphogenèse et s'éteignent au cours du développement.

L'analyse globale des gènes différentiels impliqués dans le métabolisme a révélé, pour la classe des gènes du métabolisme des acides aminés et des protéines, un plus faible nombre de gènes variant significativement d'expression dans le passage entre les stades EE et IE que dans les autres groupes de comparaison. Cette observation suggère ainsi un fonctionnement métabolique relativement similaire, au moins en ce qui concerne cette classe métabolique, des deux groupes de stades embryonnaires les plus précoces analysés dans cette étude. L'analyse détaillée des gènes impliqués dans le métabolisme des acides aminés, annotés par Wilson et collaborateurs (2010), conforte cette observation avec seulement 2 gènes différentiels pour la comparaison EE-IE sur les 23 révélés par cette analyse. Parmi ces 23 gènes, 17 gènes ont une expression

qui augmente dans au moins l'une des trois comparaisons. Ces résultats suggèrent que le métabolisme des acides aminés s'intensifie graduellement au cours du développement chez le puceron du pois.

Parmi les gènes codant les enzymes des voies de biosynthèse et de dégradation des acides aminés, tels qu'ils ont été annotés par Wilson et collaborateurs (2010), nous avons mis en évidence que deux voies métaboliques sont plus sollicitées que d'autres et montrent le plus grand nombre de gènes différentiels : 1) la voie de biosynthèse de la phénylalanine et tyrosine et 2) la voie de dégradation de l'acide aspartique et de l'asparagine. Plus particulièrement, nous avons montré que les deux seules activités enzymatiques (EC 2.6.1.1 et 1.14.16.1) codées par le génome du puceron pour synthétiser la phénylalanine et la tyrosine sont sollicitées au cours du développement. Ainsi, le gène ACYPI004243 codant pour l'asparatate transaminase (EC 2.6.1.1), permettant, à partir de l'acide aspartique, la synthèse d'acide glutamique puis de phénylalanine, présente une augmentation significative de son expression du stade embryonnaire IE jusqu'au premier stade larvaire. Le second gène (ACYPI007803), codant la phénylalanine 4-monooxygénase, catalysant la synthèse de la tyrosine, montre également une augmentation significative d'expression entre les stades IE et LE. Ces résultats sont en accord avec les données sur l'évolution de la concentration en acides aminés au cours du développement embryonnaire et larvaire du puceron. Considérées dans leur ensemble, nos analyses montrent que les variations de concentration de l'acide aspartique, de l'acide glutamique, de la phénylalanine et de la tyrosine au cours du développement sont fortement corrélées avec le profil d'expression des gènes impliqués dans leurs biosynthèses (cf Résultats §1.2 p 130) (Figure 65).



**Figure 65. Gènes variant significativement d'expression au cours du développement du puceron du pois dans la voie de biosynthèse de la phénylalanine et de la tyrosine et quantification des acides aminés associés à cette voie.**

**A)** La réaction de transamination, réalisée par l'activité enzymatique EC 2.6.1.1, permet la synthèse d'acide glutamique et de phénylalanine. La phénylalanine 4-monooxygénase (EC 1.14.16.1) catalyse la synthèse de tyrosine.

**B)** Suivi de l'intensité d'expression (moyenne des 3 réplicats biologiques  $\pm$  SE) des deux gènes de cette voie variant significativement d'expression au cours du développement et quantification des acides aminés impliqués dans cette voie. Sont indiqués : par la ligne violette, l'expression du gène ACYPI004243 ; par la ligne verte, l'expression du gène ACYPI007803 ; par les histogrammes : vert, l'acide aspartique ; rose, l'acide glutamique ; rouge la phénylalanine ; bleu, la tyrosine. Les intensités d'expression des deux gènes ACYPI004243 et ACYPI007803 sont exprimées en log2. Dans l'analyse métabolique, la proportion des acides aminés (aspartate, glutamate, tyrosine et phénylalanine) est exprimée en % par rapport à l'ensemble des acides aminés libres.

Ainsi, l'augmentation au stade LE de l'expression du gène ACYPI007803 peut directement être reliée à l'élévation de la proportion en tyrosine. De même, on peut émettre l'hypothèse que la diminution, au cours du développement, de la proportion en acide aspartique et en acide glutamique serait liée à la sur-activation de l'aspartate transaminase permettant ainsi la synthèse de phénylalanine. Cette dernière serait immédiatement transformée en tyrosine compte tenu de la faible variation du niveau de phénylalanine observée au cours du temps.

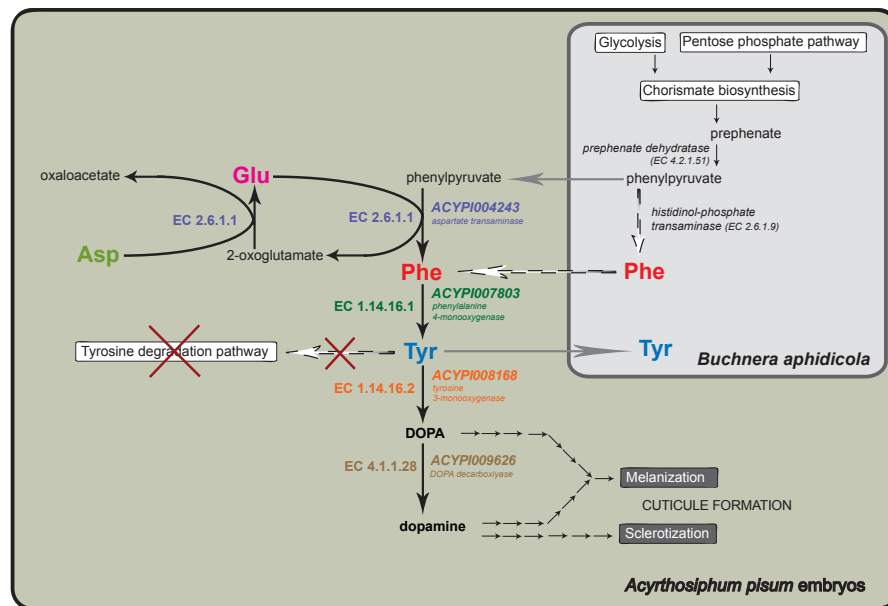
Parmi les insectes dont le génome est actuellement séquencé et annoté, le puceron du pois est le seul à posséder différentes copies du gène codant l'aspartate transaminase (EC 2.6.1.1) (Wilson, *et al.*, 2010). Une analyse détaillée de ces quatre gènes, réalisée avec la base AcypiCyc puis par la méthode PRIAM, m'a permis de montrer qu'ils codent tous pour des enzymes catalysant la transamination de divers acides aminés, confirmant ainsi leur rôle fonctionnel. De ces quatre gènes, seuls les gènes

ACYPI000044 et ACYPI006213 sont fortement exprimés dans tous les stades de développement analysés dans ma thèse. Il est intéressant de remarquer que ces deux mêmes gènes se sont révélés comme étant fortement exprimés dans d'autres compartiment corporels du puceron (les bactériocytes ou les compartiments non symbiotiques pris dans leur ensemble) comme il a été montré dans un travail récent d'Hansen et Moran (2011) basé sur une analyse de quantification des transcrits par RNAseq. Nos résultats montrent néanmoins que seul le profil d'expression du gène ACYPI004243, au cours du développement embryonnaire, est parfaitement synchrone avec l'augmentation de la proportion en tyrosine observée au stade LE et est donc potentiellement responsable de son accumulation. Sur la base des données actuellement disponibles sur ce gène, nous ne sommes pas en mesure d'expliquer comment son activation spécifique dans les stades embryonnaires tardifs et le premier stade larvaire puisse être régulée. Une analyse bioinformatique poussée des quatre gènes (localisation chromosomique, domaines protéiques, analyse phylogénétique de la séquence) codant l'activité enzymatique 2.6.1.1, est actuellement en cours dans l'UMR BF2I.

Dans la première partie de mon travail de thèse, j'ai émis l'hypothèse que l'accumulation de tyrosine observée en fin de développement embryonnaire et dans le développement larvaire pourrait constituer une forme de stockage en vue d'une utilisation notamment comme précurseur pour le processus du tannage cuticulaire. La maturation de la cuticule chez les insectes inclut deux processus séparés, appelé mélanisation (noircissement de la cuticule) et sclérotisation (durcissement de la cuticule) (Honegger, *et al.*, 2008). La dopamine a une importance centrale pour ces deux processus (Andersen, *et al.*, 2006). Celle-ci est produite à partir de la tyrosine lors de deux étapes : la tyrosine est d'abord hydrolysée en 3,4-dihydroxyphénylalanine (DOPA) par la tyrosine 3-monooxygénase (EC 1.14.16.2), puis la dopamine est produite à partir de la DOPA grâce à la dopa décarboxylase (EC 4.1.1.28). L'analyse de l'expression des gènes codant ces deux activités enzymatiques a mis en évidence deux gènes (ACYPI008168 et ACYPI009626) dont l'expression augmente significativement entre les stades IE et LE, puis diminue au stade L1. La similarité de leurs profils d'expression avec celui du gène ACYPI007803 permet ainsi de supporter l'hypothèse de l'utilisation de la tyrosine comme précurseur pour le tannage cuticulaire.

Il est intéressant de noter que toute cette cascade de réactions (réactions successives de synthèse de la phénylalanine, de la tyrosine, de la DOPA et de la dopamine) ne repose pas uniquement sur les capacités de

biosynthèse du puceron. Le puceron dépend fortement de sa bactérie symbiotique pour la fourniture de phénylpyruvate, précurseur indispensable à la biosynthèse de phénylalanine par l'aspartate transaminase codée par le génome du puceron (cf Introduction §2.4.4 p 59) (Wilson, *et al.*, 2010). Une étude, à laquelle j'ai participé, réalisée par notre UMR en collaboration avec le laboratoire de Tom Wilkinson à Dublin, nous a permis de montrer que, au cours du développement du puceron du pois, aucune régulation n'agit sur la transcription des gènes de la bactérie symbiotique impliqués dans la biosynthèse de phénylpyruvate (Birmingham, *et al.*, 2009b). Dans cette étude, à l'aide d'une puce à ADN dédiée au génome complet du symbiote primaire d'*A. pisum*, nous avons comparé les niveaux d'expression des gènes de *B. aphidicola* appartenant aux trois groupes de stades embryonnaires EE, IE, LE avec ceux des bactéries symbiotiques maternelles. Cette étude a révélé que 22 % (soit 12 gènes) des gènes impliqués dans la biosynthèse des acides aminés chez *B. aphidicola* sont différentiellement exprimés chez les embryons. Néanmoins, bien que le niveau d'expression des gènes de *B. aphidicola* impliqués dans la biosynthèse de phénylpyruvate soit élevé, ces gènes ne sont pas régulés significativement au cours du développement embryonnaire du puceron du pois. L'ensemble de ces résultats suggère que la contribution de la bactérie symbiotique est importante pour la production constante des précurseurs nécessaires à la production et la maturation de la cuticule du puceron, mais que la régulation transcriptionnelle spécifique de ces voies se situe au niveau des gènes de l'hôte (**Figure 66**).



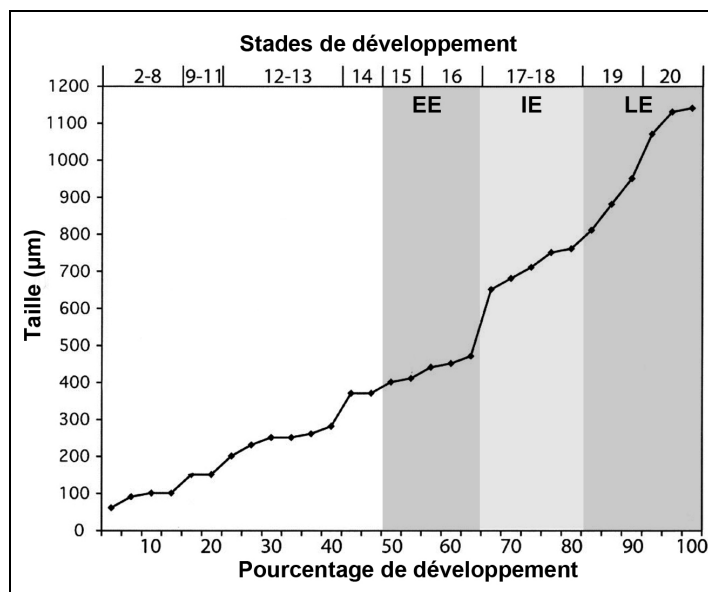
**Figure 66. Voie de biosynthèse de la dopamine placée dans le contexte de la symbiose *A. pisum* / *B. aphidicola*.**

Les gènes et activités enzymatiques indiqués en couleur sont apparus comme sollicités au cours du développement embryonnaire (D'après Wilson et al, 2010).

L'analyse de l'enrichissement, en gènes différemment exprimés, des classes fonctionnelles de gènes (analyse des classes GO), nous a permis de mettre en évidence des changements significatifs d'expression au cours du développement du puceron du pois pour de nombreux gènes impliqués dans la formation de la cuticule. Le profil global de l'expression de ces gènes montre une augmentation du niveau d'expression entre les stades embryonnaires IE et LE puis une diminution au stade larvaire L1. Cette observation est en accord avec la description détaillée des stades embryonnaires réalisée par Miura et collaborateurs en 2003, qui indique qu'au stade 20 du développement parthénogénétique (dernier stade avant la ponte) la cuticule est pleinement formée (Miura, *et al.*, 2003). L'analyse des classes GO, nous a également permis de mettre en évidence, pour les gènes différemment exprimés dans la comparaison IE-LE, des fonctions liées au métabolisme et à la biosynthèse de cire cuticulaire (GO : 0010166 et GO : 0010025) (**Figure 60C**), dont le rôle est celui de protéger l'insecte de la dessiccation en recouvrant la cuticule de composés hydrophobes. En particulier, l'expression de ces gènes montre un pic en correspondance des stades embryonnaires tardifs (LE).

L'analyse des classes GO a également montré que de nombreux gènes codant pour des transporteurs d'acides aminés sont différemment exprimés au cours du développement du puceron du pois. Soixante pour

cent des gènes annotés comme étant des transporteurs d'acides aminés et de sodium, potassium et chlore, et présents sur la puce « ACYPI v1.0 » varient d'expression au cours du développement de l'insecte. La majorité des gènes différentiels appartenant à la famille de transporteurs AAAP (*amino acid/auxin permease family*) diminuent d'expression entre les stades IE et L1. En revanche, pour les gènes de la famille de transporteurs APC (*amino acid/polyamine/organocation transporters*), la quasi-totalité des gènes différentiels augmente d'expression dans le passage aux stades embryonnaires tardifs. Il semblerait donc que, en fonction de leur rôle, les gènes codant des fonctions de transport soient sollicités à des étapes distinctes du développement. Avec celle réalisée par Hansen et Moran (2011) caractérisant l'expression des gènes codant des transporteurs dans les bactériocytes et l'ensemble des compartiments corporels non symbiotiques, notre analyse constitue l'une des premières études à large échelle des transporteurs d'acides aminés dans différents compartiments corporels du puceron du pois et sera certainement poursuivie et approfondie dans l'UMR BF2I. Dans le cadre de ma thèse, j'ai focalisé mon attention sur un groupe de transporteurs appartenant à la famille APC : les transporteurs codés par les gènes *slimfast*. Suivant l'annotation de Price et collaborateurs (2011), 10 de ces gènes sont présents dans le génome d'*A. pisum*, contre la seule copie retrouvée chez *Drosophila melanogaster*. Or, les gènes *slimfast* semblent être très importants pour la croissance des insectes pendant le développement embryonnaire et larvaire. L'inhibition du gène *slimfast* par la technique du RNAi chez la drosophile a pour effet d'entraîner une forte réduction de la croissance, reproduisant ainsi des phénotypes similaires à ceux observés lorsque l'insecte est élevé sur un milieu nutritionnel pauvre (Colombani, *et al.*, 2003). Dans notre étude, six (ACYPI003523, ACYPI005156, ACYPI003240, ACYPI000537, ACYPI00584, ACYPI002633) des 10 orthologues du gène *slimfast* du puceron du pois se sont également révélés différentiels et présentent des augmentations significatives d'expression entre les stades EE et IE, puis entre les stades IE et LE. Il est important de noter que, chez le puceron *A. pisum*, la plus forte augmentation de la taille des embryons en développement est remarquée justement en correspondance des stades 17-18 (groupe embryonnaire IE de notre étude) et 19-20 (groupe embryonnaire LE) (**Figure 67**, Miura *et al.*, 2003). Nous pouvons donc émettre l'hypothèse que ces 6 transporteurs d'acides aminés orthologues jouent un rôle dans l'activation de la croissance en fin de développement parthénogénétique du puceron du pois.



**Figure 67. Evolution de la taille des embryons parthénogénétiques du puceron du pois au cours de leur développement.**

La taille, exprimée en  $\mu\text{m}$ , est exprimée en fonction des stades de développement et du pourcentage de développement (d'après Miura *et al.*, 2003). Les zones grisées correspondent au trois groupes de stades embryonnaires (EE, IE, LE) analysés durant notre étude.

Cette étude transcriptomique nous a permis de confirmer l'importance de la tyrosine au cours du développement embryonnaire et larvaire du puceron du pois avec la mise en évidence des gènes clé dans la voie de biosynthèse de cet acide aminé aromatique. Nous avons également montré que l'ensemble des processus liés à la formation de la cuticule et de sa maturation est activé durant les stades embryonnaires tardifs, comme démontré par l'induction de gènes codant la synthèse de protéines cuticulaires, de cire et de précurseurs pour le tannage cuticulaire (tyrosine, DOPA et dopamine) dans ces stades précédant la ponte. Enfin, l'importance des acides aminés pour le bon développement des embryons a été confirmée par la mise en évidence d'une forte activation du métabolisme des acides aminés (forte expression mais également forte induction au cours du développement des gènes impliqués dans ces voies) mais également par l'augmentation dans le temps de l'expression de gènes codant leurs transporteurs.





## 3 Confirmation du rôle fonctionnel du gène ACYPI007803 mis en évidence dans l'analyse transcriptomique

### 3.1 Problématique de l'étude

### 3.2 Inactivation du gène ACYPI007803

### 3.3 Discussion

---

#### 3.1 Problématique de l'étude

La comparaison des résultats obtenus dans les deux approches précédentes, a permis d'identifier non seulement une voie clé de l'association symbiotique (celle de la biosynthèse des acides aminés aromatiques) lors du développement embryonnaire du puceron du pois, mais également les gènes cibles à l'intérieur de cette voie. Pour appréhender le rôle fonctionnel de ces gènes, nous avons décidé de perturber l'expression de ces gènes par la technique de l'ARN interférence (RNAi). Cette technique a été largement utilisée pour inactiver de manière transitoire l'expression de gènes chez les insectes (Belles, 2010) et elle a été récemment appliquée au modèle du puceron, où l'administration est possible par injection ou par traitement oral. La microinjection de siRNA a été utilisée par Mutti et collaborateurs (2006 ; 2008) pour inactiver un gène exprimé dans les glandes salivaires du puceron adulte, tandis que Jaubert-Possamai et collaborateurs (2007) ont microinjecté des dsRNA pour inactiver la fonction des gènes cathepsine-L et calréticuline. L'inactivation de gènes par administration de dsRNA par voie alimentaire est également possible chez le puceron du pois, où les gènes aquaporine et vac-ATPase ont été inactivés respectivement par Shakesby et collaborateurs (2009) et Whyard et collaborateurs (2009). L'inactivation génique obtenue chez le puceron du pois par ces différentes approches ne dépasse pas les 50 %, néanmoins elle semble suffisante pour mettre en évidence des phénotypes intéressants. Cela est bien représenté par l'étude de Mutti et collaborateurs (2008), où les auteurs ont montré que l'inhibition partielle de la protéine C002, exprimée préférentiellement dans les glandes salivaires, interfère grandement avec la prise alimentaire du puceron du pois, causant ainsi la mort des pucerons traités.

Dans le cadre de ma thèse, je me suis concentrée sur le gène ACYPI007803, codant pour la phénylalanine-4-monooxygénase

responsable de la synthèse de la tyrosine, acide aminé qui s'est révélé crucial pour la physiologie nutritionnelle des embryons du puceron et leurs échanges métaboliques avec *B. aphidicola*. L'efficacité de l'inhibition de l'expression génique dans les différents tissus / compartiments étant dépendante de la méthode d'administration (Sapountzis *et al.*, communication personnelle), nous avons décidé d'effectuer l'administration des ARN double brin par injection et par voie alimentaire en parallèle. L'effet du traitement a été évalué par suivi de mortalité et de fécondité et le niveau d'inactivation du gène a été évalué par RT-PCR en temps réel pour différents compartiments tissulaires du puceron.

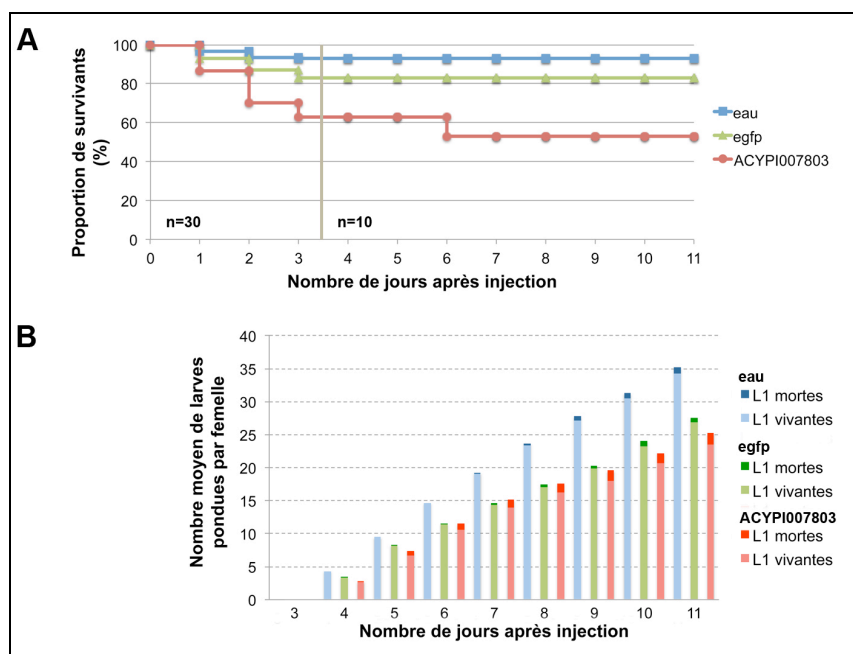
---

## **3.2 Inactivation du gène ACYPI007803**

---

### **3.2.1 Suivi de la survie et de la reproduction**

L'administration des ARN interférents par injection est réalisée sur des larves de stade L3 maintenues ensuite sur plante pour le suivi de mortalité et de fécondité. Un lot de 30 pucerons par condition (eau : contrôle négatif de l'injection, egfp : contrôle négatif d'injection d'ARN db, ACYPI007803 : ARN interférent testé) sont injectés puis suivi durant 3 jours (Figure 68A). Au 3ème jour, 10 pucerons sont prélevés aléatoirement. Chaque individu est ensuite placé sur une plante isolée afin de réaliser le suivi de la fécondité de chaque femelle (Figure 68 A et B).



**Figure 68. Effet de l'injection d'ARN db dans des pucerons au stade L3 : suivi de survie et de fécondité.**

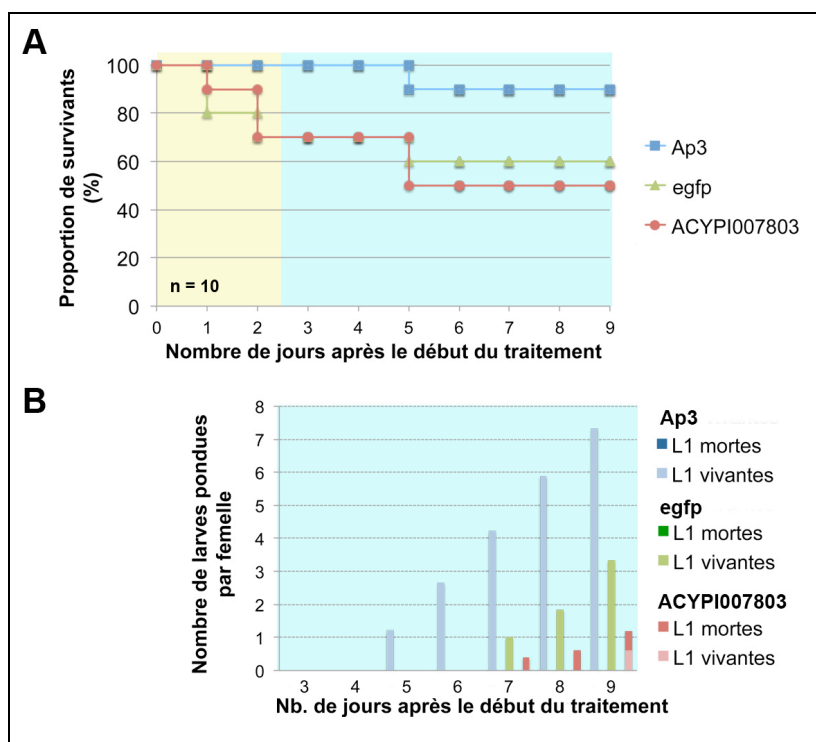
**A)** Proportion de pucerons survivants par groupe d'injection (n=30 à J0 puis n=10 à J3).

**B)** Moyenne du nombre cumulé de larves (mortes ou vivantes) pondues par femelle (n=10 à J3). Sont représentées : en bleu, les données relatives aux pucerons injectés avec de l'eau ; en vert, les données relatives aux pucerons injectés avec des ARN db dirigés contre egfp ; en rouge, les données relatives aux pucerons injectés avec des ARN db dirigés contre le gène ACYPI007803.

Le suivi de la survie après injection révèle un plus grand nombre de morts chez les pucerons injectés avec des ARN db dirigés contre le gène ACYPI007803 que chez les autres groupes (53 % de survivants contre 83 % et 93 % pour l'egfp et l'eau respectivement à J11) (Figure 68A). L'ensemble des femelles isolées à J3 ont pondu durant la période du suivi de fécondité. On remarque, toutefois, un plus faible taux de reproduction pour les femelles injectées avec des ARN db : 35 larves sont pondues par femelle en 8 jours suite à l'injection avec de l'eau contre 28 et 26 larves pour les femelles injectées avec des ARN db dirigés contre egfp et ACYPI007803 respectivement. En outre, les femelles injectées avec des ARN db dirigés contre l'ACYPI007803 présentent 2 fois plus de larves mortes à la ponte que dans les 2 autres conditions.

L'administration d'ARN interférents par voie alimentaire a été réalisée sur des lots de 10 larves L3 par condition (Ap3 : contrôle négatif du milieu artificiel, egfp : contrôle négatif d'ARN db, ACYPI007803 : ARN interférent testé). Ces larves sont nourries sur milieu artificiel contenant ou non des ARN db durant 2 jours puis replacées sur plante pour

être suivies sur une durée totale de 9 jours (Figure 69 A et B). Le suivi de mortalité et de fécondité n'a pas été poursuivi au delà de 9 jours, car lorsque la croissance des pucerons se réalise sur milieu artificiel, la majorité des pontes sont effectuées durant la première semaine après la mue imaginale.



**Figure 69. Effet de l'administration d'ARN db par voie alimentaire : suivi de survie et de fécondité.**

**A)** Proportion (en %) des pucerons survivants par groupe de traitement (n=10 à J0). La zone en jaune indique les jours de traitement avec le milieu complété en ARN db, la zone en turquoise indique les jours où les pucerons sont replacés sur plante.

**B)** Moyenne du nombre cumulé de larves (mortes ou vivantes) pondues par femelle. Sont représentées : en bleu, les données relatives aux pucerons sur milieu Ap3; en vert, les données relatives aux pucerons traités avec des ARN db dirigés contre egfp ; en rouge, les données relatives aux pucerons traités avec des ARN db dirigés contre le gène ACYPI007803.

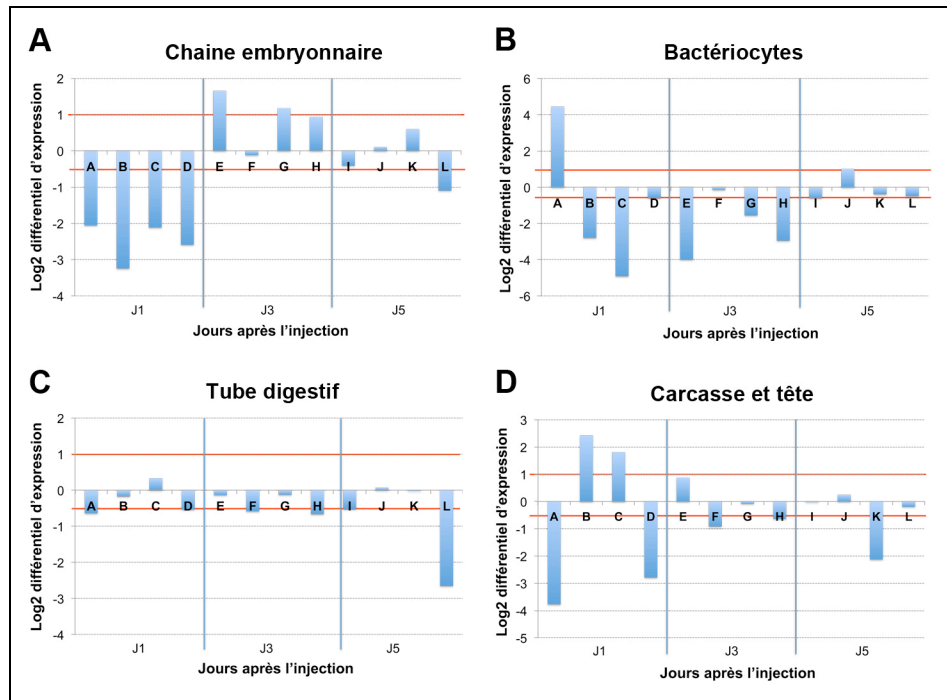
On remarque un plus faible taux de survie pour les pucerons traités avec des ARN db : 50 % et 60 % des pucerons survivent au neuvième jour après ingestion d'ARN db dirigés respectivement contre le gène ACYPI007803 ou egfp, contre 90 % de survie pour les pucerons ayant ingéré uniquement du milieu Ap3 (Figure 69A). Concernant la fécondité des individus, toutes les femelles élevées sur milieu Ap3 ou ayant ingéré des ARN db dirigés contre egfp ont pondu au moins une fois durant les 5 derniers jours d'observation. En revanche, pour les femelles ayant ingéré

des ARN db dirigés contre ACYPI007803, 2 des 5 survivantes n'ont jamais pondu. La moyenne du nombre cumulé de larves pondues par femelle est également plus faible chez les femelles ayant ingéré des ARN interférents dirigés contre le gène cible (1,2 larve par femelle contre 3,3 pour egfp et 7,3 pour l'Ap3). Ces femelles sont également les seules à avoir pondu des larves mortes (50 % de leur ponte).

---

### 3.2.2 Quantification du niveau d'expression du gène ACYPI007803 après inactivation par RNAi

Le niveau d'extinction de l'expression du gène ACYPI007803 a été évalué chez des pucerons injectés avec des ARN interférents. Ainsi, un, trois et cinq jours après l'injection des larves L3, 4 pucerons appartenant à chaque groupe expérimental (injectés avec de l'eau ou avec des ARN db dirigés contre egfp ou le gène d'intérêt) sont disséqués afin d'isoler 4 compartiments corporels : la chaîne embryonnaire, les bactériocytes, le tube digestif et la carcasse avec la tête. Les niveaux d'expression du gène ACYPI007803 et d'un gène de normalisation (ACYPI000074) sont dosés par RT-PCR en temps réel dans chacun de ces compartiments corporels. Les analyses des données ont été réalisées à l'aide du logiciel REST (cf Matériels et Méthodes §3.6.4 p 117). Le niveau d'expression du gène cible est normalisé par l'expression du gène de normalisation. De plus, pour correctement quantifier le niveau d'extinction du gène d'intérêt suite au traitement, nous avons choisi de calculer l'expression différentielle du gène ACYPI007803 dans la modalité d'intérêt (injection d'ARN db contre le gène cible) comparativement à l'une des conditions de contrôle (injection d'ARN db contre egfp). La Figure 70 présente les résultats obtenus pour les quatre compartiments corporels chez les quatre individus analysés par jour de prélèvement.



**Figure 70. Niveau d'inhibition de l'expression du gène ACYPI007803 suite à l'injection d'ARN db : dosage par RT-PCR en temps réel dans différents compartiments corporels.**

Le différentiel d'expression moyen du gène ACYPI007803 est représenté pour les pucerons injectés avec des ARN db dirigés contre le gène cible par rapport à ceux injectés avec des ARN bd dirigés contre egfp. Ces rapports sont indiqués pour 4 tissus : A) la chaîne embryonnaire, B) les bactériocytes, C) le tube digestif et D) la carcasse et la tête appartenant à 4 individus (représentés par les lettres A à L) par temps de cinétique (J1, J3, J5). Les seuils de significativité du différentiel d'expression (lignes rouges) sont fixés à +1 dans le cas d'une sur-expression (correspondant à une augmentation de 2 fois par rapport à la valeur de référence) et à -0,5 dans le cas d'une sous-expression (correspondant à une diminution de 2 fois par rapport à la valeur de référence).

D'un point de vue général, les différentiels d'expression obtenus varient en fonction des quatre tissus étudiés (Figure 70). Pour les tissus embryonnaires, nous obtenons, pour le temps J1, une nette diminution du niveau d'expression du gène ACYPI007803 chez les quatre individus. En revanche, pour les autres points de la cinétique, aucun changement d'expression probant n'est observé (Figure 70A). En ce qui concerne les bactériocytes, des réductions significatives du niveau d'expression sont observées, un et trois jours après l'injection d'ARN interférents, pour les  $\frac{3}{4}$  des individus. On notera toutefois la réaction différente du puceron « A », qui est le seul individu à présenter une sur-expression significative du gène ACYPI007803 dans ces tissus (Figure 70B). Aucun résultat concluant n'a été obtenu pour le tube digestif, en effet pour les trois points de la cinétique très peu de variations d'expression sont observées pour ce tissu (Figure

70C). De même, de faibles différentiels sont observés pour les tissus comprenant la tête et la carcasse des pucerons pour les jours 3 et 5, et de fortes variations du niveau d'expression sont observées entre les individus du jour 1, avec 2 sur-expressions significatives et 2 sous-expressions significatives (Figure 70D).

Ces résultats mettent ainsi en évidence que l'injection d'ARN db dirigés contre le gène ACYPI007803, chez le puceron du pois, a un impact sur le niveau de transcrits de ce gène. Cette diminution du niveau d'expression apparaît dans des tissus dépendantes et de plus forte intensité le lendemain de l'injection.

---

### 3.3 Discussion

Les études métaboliques et transcriptomiques réalisées au cours de ma thèse m'ont permis de mettre en évidence l'importance de la tyrosine dans le développement embryonnaire et larvaire précoce du puceron du pois. Le rôle du gène ACYPI007803 dans la synthèse de cet acide aminé, en particulier pour son accumulation durant les stades tardifs du développement embryonnaire, a été démontré par l'analyse de son profil d'expression. Nous avons ainsi décidé de perturber l'expression de ce gène par la technique d'ARN interférence afin de confirmer son rôle fonctionnel. Pour cela nous avons administré au puceron du pois des ARN db dirigés contre ce gène par injection dans l'hémolymphe ou par voie alimentaire. L'effet du traitement a été évalué par les suivis de la mortalité et de la fécondité, et mis en relation avec l'éventuelle inhibition du gène produite par l'interférence génique.

Concernant la mortalité des individus, nous avons constaté, pour les deux méthodes d'administration, une plus forte mortalité chez les individus traités avec des ARN db dirigés contre ACYPI007803 par rapport aux contrôles (eau/milieu Ap3 ou ARN db dirigés contre le gène egfp). Toutefois, lors des expériences d'administration par voie alimentaire, nous avons également observé une plus forte mortalité des pucerons traités par ARN db dirigés contre egfp par rapport au contrôle négatif (Ap3). On peut donc supposer un éventuel effet toxique des ARN db sur les pucerons traités *per os*. Ce type d'effet a déjà été observé dans des expériences d'administration d'ARN db par voie alimentaire précédemment réalisées dans notre unité (Sapountzis *et al.*, communication personnelle). Pour les deux modalités d'administration (injection ou alimentaire) la mortalité apparaît principalement durant les trois premiers jours, comme cela a été également constaté dans les études publiées sur les approches RNAi chez le



puceron du pois (Jaubert-Possamai, *et al.*, 2007 ; Mutti, *et al.*, 2006 ; Mutti, *et al.*, 2008 ; Shakesby, *et al.*, 2009 ; Whyard, *et al.*, 2009).

Le suivi de la fécondité journalière des femelles élevées sur milieu artificiel Ap3 montre une réduction du nombre de larves pondues par rapport aux femelles élevées sur plante. Cette observation est en accord avec les observations réalisées par Sasaki et collaborateurs (1991) qui observent, sur milieu Ap3, une réduction d'environ deux fois et demi du nombre de larves pondues par rapport à celui pour les pucerons élevés sur *V. faba*. On constate également un décalage du début de la ponte entre les deux méthodes d'élevage. Cette observation n'est pas surprenante compte tenu du développement ralenti des pucerons élevés sur milieu artificiel (Febvay, *et al.*, 1988 ; Sasaki, *et al.*, 1991). Ainsi l'arrivée plus tardive au stade adulte entraîne un décalage du début de la ponte.

Concernant la comparaison entre les différents traitements, on remarque, pour les deux méthodes d'administration, une fécondité réduite chez les femelles traitées avec des ARN db par rapport aux femelles des groupes contrôles (eau ou Ap3). L'administration d'ARN db semble ainsi perturber la fécondité des pucerons. Bien que, pour les femelles injectées avec des ARN db, nous n'observions aucune différence significative entre le nombre de larves pondues entre les conditions egfp et ACYPI007803, on remarque en revanche, pour l'administration des ARN db par voie orale, une diminution de la fécondité des femelles de la condition ACYPI007803 par rapport à egfp. Cela indique un effet spécifique de l'ingestion d'ARN interférents dirigés contre le gène d'intérêt sur la fécondité. De plus, l'administration d'ARN db dirigés contre ACYPI007803 paraît également avoir une influence sur la viabilité des larves pondues quel que soit la méthode d'administration. Notre étude est ainsi la première à montrer un effet du traitement RNAi sur la fécondité des pucerons traités.

Notre attention s'est ensuite portée sur le niveau d'inhibition du gène ACYPI007803. En comparant le niveau d'expression de ce gène chez les individus injectés avec des ARN db dirigés contre le gène ACYPI007803 par rapport aux individus injectés avec les ARN db dirigés contre egfp, nous avons mis en évidence des différences du niveau d'inhibition dans les quatre compartiments corporels étudiés. Ainsi, la chaîne embryonnaire et les bactériocytes sont les compartiments montrant des réductions d'expression les plus élevées. Nous avons également observé d'importantes variations d'expression entre certains individus (notamment au premier jour pour les bactériocytes et la carcasse). Ces différences peuvent sans doute s'expliquer par la variabilité inter-

individuelle en réponse au traitement RNAi, telle qu'elle a déjà été montrée par d'autres études sur le puceron du pois (Sapoutzis et al., communication personnelle ; Jaubert-Possamai *et al.*, 2007). La cinétique réalisée montre également que la plus forte inhibition de l'expression du gène ACYPI007803 est observée le premier jour après l'injection et persiste jusqu'au 3<sup>ème</sup> jour (pour les bactériocytes). Il apparaît donc que l'inhibition de l'expression du gène ACYPI007803 se réalise rapidement et est de courte durée. Cela n'est pas toujours le cas dans les expériences de RNAi chez *A. pisum* où l'inactivation génique peut débuter très tôt à la suite de l'injection et persister durant 5 jours (gènes cathepsine-L et calréticuline, Jaubert-Possamai *et al.*, 2007) ou ne débuter qu'au 3<sup>ème</sup> jour et durer jusqu'au 5<sup>ème</sup> jour (gène C002 ; Mutti *et al.*, 2006). Analysés dans leur ensemble, mes résultats ainsi que ceux des études précédentes indiquent que la durée de l'inhibition génique chez le puceron du pois dépend du gène ciblé.

En conclusion, nous avons montré dans cette étude que le gène ACYPI007803 pouvait être inactivé fonctionnellement dans les compartiments symbiotiques (chaîne embryonnaire et bactériocytes), bien que pendant une courte durée, par l'injection d'ARN db chez le puceron du pois. La diminution de l'expression de ce gène peut être corrélée à une augmentation de la mortalité des larves pondues par les femelles traitées, confirmant ainsi le rôle du gène ACYPI007803 dans le développement de cet insecte.



# Partie IV – Conclusions et perspectives

Les pucerons sont considérés parmi les principaux ravageurs des cultures dans les zones tempérées. Leur dangerosité pour les cultures est en partie due à leur phénoménale capacité de reproduction et aux stratégies reproductives mises en place par ces insectes : le télescopage des générations ainsi que des périodes récurrentes où la reproduction se réalise par parthénogénèse (Dixon, *et al.*, 1987 ; Dixon, *et al.*, 1998). La reproduction parthénogénétique est reconnue comme participant largement à leur dangerosité, en provoquant une véritable explosion démographique de ces insectes pendant l'été. Le fort taux de croissance auquel sont soumis les embryons vivipares implique qu'une quantité importante de nutriments soit utilisée par ceux-ci durant le développement parthénogénétique du puceron. Néanmoins, les études sur la physiologie nutritionnelle des pucerons au cours de leur développement embryonnaire et le passage à la phase larvaire restent rares. De plus, si le rôle de *B. aphidicola* dans la physiologie nutritionnelle des larves et des adultes de pucerons a largement été démontré (travaux de Gérard Febvay et collaborateurs), peu d'études se sont intéressées à la possible contribution de la bactérie symbiotique au développement embryonnaire de son insecte hôte avant mon travail de thèse. Ainsi, les objectifs centraux de mon projet ont été la caractérisation des besoins nutritionnels des embryons du puceron du pois à différentes étapes de leur développement parthénogénétique et la détermination de voies et gènes clé régulant les passages entre différents stades embryonnaires et larvaires et les interactions trophiques avec *B. aphidicola*.

Le premier volet de ce travail de thèse a consisté à déterminer les besoins en acides aminés de différents stades de développement embryonnaires et larvaires du puceron du pois. L'étude de la teneur et de la composition en acides aminés protéiques et libres a permis de mettre en évidence une évolution des exigences métaboliques durant le développement du puceron. Ce premier résultat souligne l'importance d'étudier séparément, dans la mesure du possible, les différents stades embryonnaires.

Dans un deuxième temps, nous avons mis au point un système de culture adapté aux embryons afin de pouvoir différencier l'implication de chaque compartiment (maternel et embryonnaire) dans la nutrition des embryons. Le suivi des embryons appartenant au groupe LE, mis en culture dans des milieux ayant des compositions différentes en acides aminés, a montré de plus faibles croissance et synthèse protéique chez les embryons se développant en milieu carencé. La concentration en acides aminés du milieu influence donc la croissance des embryons, montrant par conséquent la dépendance des embryons au compartiment maternel pour leur

approvisionnement en acides aminés. Le milieu GRS, que nous avons utilisé comme milieu carencé, est pauvre en divers acides aminés, essentiels et non essentiels. Nous avons comparé la croissance sur ce milieu avec celle sur milieu GAp3, dont la concentration en acides aminés reproduit le profil observé chez *A. pisum*. A partir de notre milieu GAp3, il serait intéressant par la suite de réaliser des suivis de croissance sur des milieux ayant des carences plus ciblées, comme cela a pu être effectué pour les embryons du puceron *Aphis fabae* (Bermingham, *et al.*, 2010). Ces expériences permettraient ainsi de préciser de quels acides aminés, fournis par le compartiment maternel, dépendent le plus les embryons. L'isolement des embryons du compartiment maternel et leur maintien en milieu de culture nous permettent également d'envisager la détermination des capacités métaboliques des embryons par la réalisation d'expériences de radiotraçage. Des acides aminés marqués ( $^{14}\text{C}$  ou  $^{15}\text{N}$ ) pourraient être incorporés dans le milieu de culture permettant ainsi de suivre leur intégration et devenir dans les embryons. Couplée à des carences ciblées, cette technique permettrait non seulement de déterminer les capacités de synthèse des embryons mais aussi de celle de leurs bactéries symbiotiques. Le milieu GAp3 s'est révélé capable de couvrir seulement partiellement les besoins des embryons appartenant à des groupes de stades moins avancés (EE et IE). L'analyse des pools d'acides aminés de ces embryons en fin de culture pourrait nous permettre d'identifier les principales carences en ces composés. Il est également possible que le milieu GAp3 soit déficient en d'autres éléments que les acides aminés. Cette hypothèse est également supportée par le travail de Wilkinson et Ishikawa (2000), qui ont montré que l'injection d'acides aminés essentiels dans des pucerons aposymbiotiques augmente le nombre d'embryons sans toutefois rétablir des chaînes ovariennes semblables à celles des pucerons symbiotiques. Nous pourrions, par exemple, compléter le milieu GAp3 en d'autres composés nécessaires à la croissance embryonnaire des pucerons, tels que les vitamines, et évaluer leur effet sur la croissance des embryons précoces et intermédiaires.

De manière générale, cette approche métabolique a permis de mettre en évidence le rôle important de trois acides aminés dans le développement embryonnaire et le passage aux phases larvaires chez le puceron du pois : les acides aspartique et glutamique et la tyrosine. Ces acides aminés sont ceux qui changent le plus grandement de proportion au cours du développement, suggérant une utilisation différentielle par des embryons plus ou moins âgés. Ils se sont également révélés comme pouvant être limitant pour la croissance des embryons en milieu de culture carencé. Ainsi, les acides aspartique et glutamique ont montré une diminution

progressive de leur concentration au fil du développement suggérant une plus grande mobilisation dans les stades les plus tardifs, très probablement pour la synthèse d'autres acides aminés. D'autre part, la concentration en tyrosine a présenté une importante augmentation aux derniers stades embryonnaires et au début du premier stade larvaire, suivie d'une diminution rapide chez les larves L1 plus tardives. Ce profil a été rapproché au pic pré-ecdysial de cet acide aminé décrit chez de nombreux insectes (Rahbé, *et al.*, 1986). Cette proportion importante de tyrosine pourrait alors représenter un stockage qui serait ensuite utilisé lors du tannage cuticulaire. Afin de valider cette hypothèse, il serait intéressant de poursuivre les dosages du pool d'acides aminés libres avant et après chaque mue afin de suivre les variations du niveau de tyrosine tout au long du développement larvaire chez le puceron du pois. De plus, le devenir de la tyrosine, au sein des embryons et des larves, pourrait être déterminé par l'utilisation de tyrosine radiomarquée.

Enfin, les analyses HPLC réalisées au cours de ma thèse ont nécessité l'adaptation de la méthode d'analyse à des échantillons de petite taille. Cette mise au point ouvre ainsi la voie à d'autres analyses métaboliques sur d'autres compartiments corporels chez le puceron mais également chez d'autres modèles animaux.

Après avoir mis en évidence des voies métaboliques clés dans le développement embryonnaire, le deuxième volet de cette thèse a ainsi eu pour objectif l'identification des gènes cibles à l'intérieur de ces voies. A l'aide de la puce à ADN « ACYPI v1.0 », les profils d'expression des gènes du puceron ont été analysés au cours du développement de l'insecte. Les gènes liés au métabolisme des acides aminés ont révélé de hauts niveaux d'expression mais également des variations significatives entre les différents stades étudiés. L'approche d'analyse transcriptomique a confirmé l'importance de la voie métabolique des acides aminés aromatiques dans le développement embryonnaire du puceron du pois. Nous avons notamment observé l'augmentation significative, pour les stades embryonnaires tardifs, de l'expression des deux gènes codant les enzymes impliquées dans les deux dernières étapes de la voie de biosynthèse de la tyrosine. Notre analyse montre également une forte sollicitation des voies/gènes liés à la synthèse de protéines cuticulaires, de cire et de précurseurs pour le tannage cuticulaire (tyrosine, DOPA et dopamine) dans les stades embryonnaires tardifs, ce qui permet de soutenir l'hypothèse que l'accumulation de tyrosine dans ces stades précédents la ponte serait nécessaire en vue de son utilisation pour la maturation de la cuticule.

L'analyse transcriptomique nous a également permis de remarquer que les gènes liés à la fonction de transport, et notamment des transporteurs d'acides aminés, augmentent d'expression au cours du développement embryonnaire chez le puceron du pois. Compte tenu de la nature métabolique de la symbiose entre les pucerons et *B. aphidicola* et du faible nombre de transporteurs retrouvés chez la bactérie symbiotique (Charles, *et al.*, 2011), l'étude de ces transporteurs sera certainement poursuivie dans l'UMR BF2I, afin de mieux les caractériser. Parmi les gènes liés aux fonctions de transport, j'ai pu montrer que certains orthologues du gène *slimfast* de la drosophile (transporteur appartenant à la famille des transporteurs APC) étaient particulièrement sollicités en fin de développement chez le puceron du pois. L'analyse du rôle de ce gène chez la drosophile (Colombani, *et al.*, 2003) m'a conduite à émettre l'hypothèse que les orthologues du puceron pourraient avoir un rôle important dans l'activation de la croissance des embryons dans les phases tardives du développement. Il serait intéressant d'entreprendre un travail d'analyse du rôle fonctionnel de ces gènes par la technique d'ARN interférence afin d'évaluer l'effet de leur inhibition sur la croissance des embryons du pucerons du pois.

Plus globalement, l'étude transcriptomique a permis de mettre en évidence que de nombreux gènes du développement varient significativement d'expression entre les différents groupes embryonnaires et larvaires étudiés. Ces gènes pourront être utilisés comme des marqueurs de chacun de ces groupes dans des études ultérieures. Une caractérisation plus poussée de leurs fonctions pourra également être envisagée, en débutant par l'analyse de leur localisation d'expression dans l'embryon par des techniques d'hybridation *in situ* ou de « whole mount », techniques mises au point dans d'autres modèles animaux et actuellement en plein développement dans le modèle puceron (Chang, *et al.*, 2006 ; Chang, *et al.*, 2008 ; Chang, *et al.*, 2009b).

Ayant montré que la tyrosine pouvait avoir un rôle important dans le développement tardif des embryons du puceron du pois et ayant pointé le gène responsable de sa synthèse et de son accumulation dans ces mêmes stades embryonnaires, le dernier volet de ce travail a consisté en la confirmation du rôle fonctionnel de ce gène (ACYPI007803), par la technique d'ARN interférence. Les résultats obtenus ont révélé une diminution de l'expression du gène cible dans les deux compartiments corporels symbiotiques (les chaînes embryonnaires et les bactériocytes). Cette inactivation génique, bien que partielle, est corrélée à une augmentation de la mortalité des larves pondues par les femelles traitées,



confirmant ainsi le rôle clé du gène ACYPI007803 dans le développement des embryons chez le puceron du pois. En complément de ce travail, il serait intéressant d'analyser l'effet de cette inhibition génique sur le niveau de tyrosine libre dans les embryons issus d'individus traités par RNAi. Les données obtenues par l'approche RNAi pourraient également être complétées par une étude de l'effet d'inhibiteurs enzymatiques connus pour agir sur la synthèse de tyrosine, comme l' $\alpha$ -méthylphényalanine (Greengard, *et al.*, 1976), sur la mortalité et la fécondité des pucerons.

Enfin, bien que mon projet de thèse se soit limité à l'analyse du développement embryonnaire avancé, il ouvre la voie à la caractérisation des besoins nutritionnels des embryons de puceron à des stades précoces du développement. Ce travail peut être ainsi considéré comme une étape préalable à l'étude de la mise en place de la symbiose dans les embryons parthénogénétiques, notamment grâce à la comparaison de stades embryonnaires pré-symbiotiques (précédents l'infection par *B. aphidicola*) à des stades plus tardifs, tels ceux que nous avons analysés ici.

# Partie V – Publications et Communications

## PUBLICATIONS DANS DES REVUES AVEC COMITE DE LECTURE

Birmingham J, **Rabatel A**, Calevro F, Viñuelas J, Febvay G, Charles H, Douglas A, Wilkinson T. (2009) Impact of host developmental age on the transcriptome of the symbiotic bacterium *Buchnera aphidicola* in the pea aphid *Acyrtosiphon pisum*. *Applied and Environmental Microbiology*. 75(22):7294-7

Brinza L, Vinuelas J, Cottret L, Calevro F, Rahbe Y, Febvay G, Duport G, Colella S, **Rabatel A**, Gautier C *et al.* Systemic analysis of the symbiotic function of *Buchnera aphidicola*, the primary endosymbiont of the pea aphid *Acyrtosiphon pisum*. *Comptes Rendus Biologie*, 2009, 332(11): 1034-1049.

**Rabatel A**, Bendridi N, Rey M, Duport G, Colella S, Rahbé Y, Charles H, Febvay G, Calevro F. Variation of free and proteic amino acids content during the development of parthenogenetic pea aphid embryos and assay of short-term culture of large embryos in *in vitro* experiments. *En préparation*.

**Rabatel A**, Febvay G, Gaget K, Duport G, Baa-Puyoulet P, Sapountzis P, Rey M, Bendridi N, Rahbé Y, Charles H, Calevro F, Colella S. Host regulation of integrated metabolic pathways in symbiosis: the tyrosine and cuticular protein biosynthesis during the pea aphid late embryonic and early larval development. *En préparation*.

## COMMUNICATIONS ORALES

**Rabatel A**, Bendridi N, Duport G, Colella S, Birmingham J, Rahbé Y, Wilkinson T, Charles H, Febvay G, Calevro F. Metabolic requirements in essential amino acids in parthenogenetic pea aphid embryos. 8th International Symposium on Aphids, Catania (Italie), 8-12 juin 2009.

**Rabatel A**, Bendridi N, Duport G, Rey M, Colella S, Rahbé Y, Charles H, Febvay G, Calevro F. Besoins en acides aminés des embryons de femelles parthénogénétiques du puceron du pois. Deuxième réunion du Réseau Français de Biologie Adaptative des Pucerons, Paris, 24-25 juin 2009.

**Rabatel A**, Febvay G, Gaget K, Duport G, Rahbé Y, Charles H, Calevro F, Colella S. Caractérisation du développement embryonnaire parthénogénétique dans le contexte de la symbiose : analyse du transcriptome chez le puceron du pois. 16ème Colloque de Biologie de l’Insecte, Lyon, 18-20 octobre 2010.

Parisot N, Gaget K, Colella S, **Rabatel A**, Calevro F, Duport G, Febvay G, Gabaldon T, Charles H, Rahbé Y. Analyse génomique de la fonction de transport dans le système symbiotique du puceron du pois *Acyrtosiphon pisum*. Troisième réunion du Réseau Français de Biologie Adaptative des Pucerons, Lyon, 20-21 octobre 2010.

## COMMUNICATIONS AFFICHEES

**Rabatel A**, Febvay G, Masselot P, Gaget K, Duport G, Rahbé Y, Charles H, Calevro F, Colella S. Characterization of parthenogenetic embryo development in the context of symbiosis using transcriptome analysis in the pea aphid model. EMBO Workshop « Systems Biology of Development », Ascona, Suisse, 16-20 août 2010.

Parisot N, Gaget K, Colella S, **Rabatel A**, Calevro F, Duport G, Febvay G, Gabaldon T, Charles H, Rahbé Y. Genomic analysis of transport function in the symbiocosm of the pea aphid *Acyrtosiphon pisum*. 16ème Colloque de Biologie de l’Insecte, Lyon, 18-20 octobre 2010.

**Rabatel A**, Febvay G, Masselot P, Gaget K, Duport G, Rahbé Y, Charles H, Calevro F, Colella S. Transcriptome analysis of embryo development in a parthenogenetic and symbiotic insect model, the pea aphid. Integrative PostGenomics 2010 (IPG’10), Lyon, 25-26 novembre 2010.

**Rabatel A**, Febvay G, Gaget K, Duport G, Bendridi N, Rahbé Y, Baa-Puyoulet P, Charles H, Calevro F, Colella S. Integration of metabolic pathways and host regulation in symbiosis: tyrosine and cuticular protein biosynthesis during the pea aphid embryonic development. 6th International Symposium on Molecular Insect Science. Amsterdam, 3-5 octobre 2011.



# Partie VI - Références bibliographiques



- Abisgold J. D., Simpson S. J., Douglas A. E.** Nutrient regulation in the pea aphid *Acyrtosiphon pisum* - application of a novel geometric framework to sugar and amino acid consumption. *Physiological Entomology*, 1994, **19**(2): 95-102.
- Adryan B., Teichmann S. A.** The developmental expression dynamics of *Drosophila melanogaster* transcription factors. *Genome Biology*, 2010, **11**(4): R40.
- Andersen C. L., Jensen J. L., Orntoft T. F.** Normalization of real-time quantitative reverse transcription-PCR data: a model-based variance estimation approach to identify genes suited for normalization, applied to bladder and colon cancer data sets. *Cancer Res*, 2004, **64**(15): 5245-5250.
- Andersen J. P., Schwartz A., Gramsbergen J. B., Loeschke V.** Dopamine levels in the mosquito *Aedes aegypti* during adult development, following blood feeding and in response to heat stress. *Journal of Insect Physiology*, 2006, **52**(11-12): 1163-1170.
- Arziman Z., Horn T., Boutros M.** E-RNAi: a web application to design optimized RNAi constructs. *Nucleic Acids Res*, 2005, **33**(Web Server issue): W582-588.
- Ashford D. A., Smith W. A., Douglas A. E.** Living on a high sugar diet: the fate of sucrose ingested by a phloem-feeding insect, the pea aphid *Acyrtosiphon pisum*. *J Insect Physiol*, 2000, **46**(3): 335-341.
- Baumann P., Baumann L., Lai C. Y., Rouhbakhsh D., Moran N. A., Clark M. A.** Genetics, physiology, and evolutionary relationships of the genus *Buchnera*: intracellular symbionts of aphids. *Annu Rev Microbiol*, 1995, **49**: 55-94.
- Baumann P.** Biology of bacteriocyte-associated endosymbionts of plant sap-sucking Insects. *Annu Rev Microbiol*, 2005, **59**: 155-189.
- Belles X.** Beyond *Drosophila*: RNAi in vivo and functional genomics in insects. *Annual Review of Entomology*, 2010, **55**: 111-128.
- Benjamini Y., Hochberg Y.** Controlling the false discovery rate: a practical and powerful approach to multiple testing. *Journal of the Royal Statistical Society*, 1995, **57**: 289-300.
- Bermingham J., Wilkinson T. L.** Embryo nutrition in parthenogenetic viviparous aphids. *Physiological Entomology*, 2009a, **34**(2): 103-109.
- Bermingham J., Rabatel A., Calevro F., Vinuelas J., Febvay G., Charles H., Douglas A., Wilkinson T.** Impact of Host Developmental Age on the Transcriptome of the Symbiotic Bacterium *Buchnera aphidicola* in the Pea Aphid (*Acyrtosiphon pisum*). *Appl Environ Microbiol*, 2009b, **75**(22): 7294-7297.
- Bermingham J., Wilkinson T. L.** The role of intracellular symbiotic bacteria in the amino acid nutrition of embryos from the black bean aphid, *Aphis fabae*. *Entomologia Experimentalis et Applicata*, 2010, **134**: 272-279.
- Blackman R. L.** Early development of the parthenogenetic egg in three species of aphids (Homoptera: Aphididae). *International Journal of Insect Morphology and Embryology*, 1978, **7**: 33-44.
- Blackman R. L., Eastop V. F.** An identification and information guide. In: *Aphids on the World's Trees*. Wallingford: CABI; 1994: 996.



- Blackman R. L., Eastop V. F.** Aphid on the world's crops: an identification information guide, 2nd edn. Chichester: John Wiley & Sons; 2000.
- Blanc S.** Insect transmission of viruses. In: *Microbe-Vector Interactions in vector-borne diseases*. Edited by Gillespie SHea: University Press; 2004: 43-61.
- Bluthgen N., Brand K., Cajavec B., Swat M., Herzel H., Beule D.** Biological profiling of gene groups utilizing Gene Ontology. *Genome Inform*, 2005, **16**(1): 106-115.
- Bolstad B. M., Irizarry R. A., Astrand M., Speed T. P.** A comparison of normalization methods for high density oligonucleotide array data based on variance and bias. *Bioinformatics*, 2003, **19**(2): 185-193.
- Bonnemaison L.** Contribution à l'étude des facteurs provoquant l'apparition des formes ailées et sexuées chez les Aphidinae. *Ann Epiphyt*, 1951, **2**: 1-380.
- Braendle C., Miura H., Bickel R., Shingleton A. W., Kambhampathi S., Stern D. L.** Developmental origin and evolution of bacteriocytes in the aphid-*Buchnera* symbiosis. *PLoS Biology*, 2003, **1**(1): 70-76.
- Braendle C., Davis G. K., Brisson J. A., Stern D. L.** Wing dimorphism in aphids. *Heredity*, 2006, **97**(3): 192-199.
- Brault V., Blanc S., Jacquot E.** Comment les pucerons transmettent des maladies virales aux plantes. *Biofutur*, 2007, **279**: 40-44.
- Brinza L., Vinuelas J., Cottret L., Calevro F., Rahbe Y., Febvay G., Duport G., Colella S., Rabatel A., Gautier C. et al.** Systemic analysis of the symbiotic function of *Buchnera aphidicola*, the primary endosymbiont of the pea aphid *Acyrtosiphon pisum*. *C R Biol*, 2009, **332**(11): 1034-1049.
- Brinza L., Calevro F., Duport G., Gaget K., Gautier C., Charles H.** Structure and dynamics of the operon map of *Buchnera aphidicola* sp. strain APS. *BMC Genomics*, 2010, **11**(1): 666.
- Brisson J. A., Ishikawa A., Miura T.** Wing development genes of the pea aphid and differential gene expression between winged and unwinged morphs. *Insect Mol Biol*, 2010, **19**: 63-73.
- Brough C. N., Dixon A. F. G.** The trophic chamber of (germarium) of the ovary in oviparae of the vetch aphid, *Megoura viciae* Buckton (Homoptera: Aphididae). *International Journal of Insect Morphology and Embryology*, 1989, **18**: 205-215.
- Brough C. N., Dixon A. F. G.** Structure of the trophic chamber (germarium) in virginoparae of the vetch aphid *Megoura viciae* Buckton (Homoptera: Aphididae). *International Journal of Insect Morphology and Embryology*, 1990, **19**: 155-163.
- Buchner P.** Endosymbiosis of Animals with Plant Microorganisms. New York, London, Sydney: Interscience Publisher, John Wiley and Sons, Inc.; 1965a.
- Buchner P.** Symbiosis in animals which suck plant juices. In: *Endosymbiosis of Animals with Plant Microorganisms*. Edited by Buchner P. New York: Interscience; 1965b: 210-432.
- Büning J.** Morphology, ultrastructure and germ cell cluster formation in ovarioles of aphids. *Journal of Morphology*, 1985, **186**: 209\_221.
- Büning J.** The ovary of Ectognatha, the insects. In: *The Insect Ovary: Ultrastructure, Previtellogenic Growth and Evolution*. Edited by Büning J. U.K: Chapman & Hall; 1994.

- Caillaud M. C., Losey J. E.** Genetics of color polymorphism in the pea aphid, *Acyrtosiphon pisum*. *J Insect Sci*, 2010, **10**: 95.
- Calevro F., Charles H., Reymond N., Dugas V., Cloarec J. P., Bernillon J., Rahbe Y., Febvay G., Fayard J. M.** Assessment of 35mer amino-modified oligonucleotide based microarray with bacterial samples. *J Microbiol Methods*, 2004, **57**(2): 207-218.
- Chang A., Scheer M., Grote A., Schomburg I., Schomburg D.** BRENDA, AMENDA and FRENDA the enzyme information system: new content and tools in 2009. *Nucleic Acids Res*, 2009a, **37**(Database issue): D588-592.
- Chang C. C., Lee W. C., Cook C. E., Lin G. W., Chang T.** Germ-plasm specification and germline development in the parthenogenetic pea aphid *Acyrtosiphon pisum*: Vasa and Nanos as markers. *Int J Dev Biol*, 2006, **50**(4): 413-421.
- Chang C. C., Huang T. Y., Shih C. L., Lin G. W., Chang T. P., Chiu H., Chang W. C.** Whole-mount identification of gene transcripts in aphids: protocols and evaluation of probe accessibility. *Archives of Insect Biochemistry and Physiology*, 2008, **68**(4): 186-196.
- Chang C. C., Huang T. Y., Cook C. E., Lin G. W., Shih C. L., Chen R. P.** Developmental expression of Apnanos during oogenesis and embryogenesis in the parthenogenetic pea aphid *Acyrtosiphon pisum*. *Int J Dev Biol*, 2009b, **53**(1): 169-176.
- Charles H., Heddi A., Rahbé Y.** A putative insect intracellular endosymbiont stem clade, within the Enterobacteriaceae, inferred from phylogenetic analysis based on a heterogeneous model of DNA evolution. *Comptes Rendus de l'Académie des Sciences*, 2001, **324**: 489-494.
- Charles H., Calevro F., Vinuelas J., Fayard J. M., Rahbe Y.** Codon usage bias and tRNA over-expression in *Buchnera aphidicola* after aromatic amino acid nutritional stress on its host *Acyrtosiphon pisum*. *Nucleic Acids Res*, 2006, **34**(16): 4583-4592.
- Charles H., Balmand S., Lamelas A., Cottret L., Pérez-Brocal V., Burdin B., Latorre A., Febvay G., Colella S., Calevro F. et al.** A genomic reappraisal of symbiotic function in the aphid / *Buchnera* symbiosis: reduced transporter sets and variable membrane organisations. *PLoS ONE*, 2011: (soumis).
- Christensen K. L., Patrick A. N., McCoy E. L., Ford H. L.** The six family of homeobox genes in development and cancer. *Adv Cancer Res*, 2008, **101**: 93-126.
- Claudé-Renard C., Chevalet C., Faraut T., Kahn D.** Enzyme-specific profiles for genome annotation: PRIAM. *Nucleic Acids Res*, 2003, **31**(22): 6633-6639.
- Colombani J., Raisin S., Pantalacci S., Radimerski T., Montagne J., Leopold P.** A nutrient sensor mechanism controls *Drosophila* growth. *Cell*, 2003, **114**(6): 739-749.
- Cornman R. S., Togawa T., Dunn W. A., He N., Emmons A. C., Willis J. H.** Annotation and analysis of a large cuticular protein family with the R&R Consensus in *Anopheles gambiae*. *BMC Genomics*, 2008, **9**: 22.
- Couchman J. R., King P. E.** Ovariole sheath structure and its relationship with developing embryos in a parthenogenetic viviparous aphid. *Acta Zoologica*, 1980, **61**: 147-155.
- Counce S. J.** Culture of insect embryos in vitro. *Ann N Y Acad Sci*, 1966, **139**(1): 65-78.
- Dadd R. H.** Insect nutrition : current developments and metabolic implications. *Annual Review of Entomology*, 1973, **18**: 381-420.

- Darby A. C., Welburn S. C.** Symbiont Culture. In: *Insect Symbiosis, Volume 2*. Edited by Bourtzis K, Miller TA, vol. Chapter 8. Boca Raton, Florida: CRC Press; 2006: 141-155.
- Dedryver C. A.** Puceron : des dégâts et des hommes. *Biofutur*, 2007, **279**: 22-25.
- Dinant S., Bonnemain J. L., Girousse C., Kehr J.** Phloem sap intricacy and interplay with aphid feeding. *C R Biol*, 2010, **333**(6-7): 504-515.
- Dixon A. F. G., Klingauf F. A., Kawada K.** World crop pests, Aphids their biology, natural enemies and control, volume A: Amsterdam: Elsevier; 1987.
- Dixon A. F. G.** Constraints on the rate of parthenogenetic reproduction and pest status of aphids. *Invertebrate Reproduction and Development*, 1992, **22**(1-3): 159-163.
- Dixon A. F. G.** Aphid Ecology, Second edition edn: Chapman & Hall; 1998.
- Dixon A. F. G., Kundu R.** Resource tracking in aphids: programmed reproductive strategies anticipate seasonal trends in habitat quality. *Oecologia*, 1998, **114**(1): 73-78.
- Douglas A. E.** Sulphate utilization in an aphid symbiosis. *Insect Biochem*, 1988, **18**(6): 599-605.
- Douglas A. E.** Mycetocyte Symbiosis in Insects. *Biological reviews*, 1989, **64**(4): 409-434.
- Douglas A. E.** Requirement of pea aphids (*Acyrtosiphon pisum*) for their symbiotic bacteria. *Entomologia Experimentalis et Applicata*, 1992, **65**(2): 195-198.
- Douglas A. E., Prosser W. A.** Synthesis of the essential amino acid tryptophan in the pea aphid (*Acyrtosiphon pisum*) symbiosis. *J Insect Physiol*, 1992, **38**(8): 565-568.
- Douglas A. E.** Reproductive failure and the free amino acid pools in pea aphids (*Acyrtosiphon pisum*) lacking symbiotic bacteria. *J Insect Physiol*, 1996, **42**(3): 247-255.
- Douglas A. E.** The nutritional physiology of aphids. *Advances in Insect Physiology*, 2003, **31**: 73-140.
- Douglas A. E.** Phloem-sap feeding by animals: problems and solutions. *J Exp Bot*, 2006, **57**(4): 747-754.
- Dudoit S., Shaffer J., Boldrick C.** Multiple hypothesis testing in microarray experiments. *Statistical Sci*, 2003, **18**(1): 71-103.
- Eastop V. F., Van Emden H. F.** The insect material. In: *Aphid Technology*. Edited by Van Emden HF. London and New York Academic Press; 1972: 344.
- Eastop V. F.** Aphid plant associations. In: *Coevolution and Systematics*. Edited by Stone AR, Hawksworth DL. Oxford: Clarendon Press; 1986: 35-54.
- Elliott H. J., MacDonald F. J. D., Vesik M.** Germarial structure and function in a parthenogenetic aphid, *Aphis craccivora* Koch (Hemiptera: Aphididae). *International Journal of Insect Morphology and Embryology*, 1975, **4**: 341-447.
- Febvay G., Delobel B., Rahbé Y.** Influence of the amino acid balance on the improvement of an artificial diet for a biotype of *Acyrtosiphon pisum* (Homoptera: Aphididae). *Canadian Journal of Zoology*, 1988, **66**: 2449-2453.
- Febvay G., Liadouze I., Guillaud J., Bonnot G.** Analysis of energetic aminoacid metabolism in *Acyrtosiphon pisum*: a multidimensional approach to amino acid metabolism in aphids. *Archives of Insect Biochemistry and Physiology*, 1995, **29**: 45-69.

- Febvay G., Rahbé Y., Rynkiewicz M., Guillaud J., Bonnot G.** Fate of dietary sucrose and neosynthesis of amino acids in the pea aphid, *Acyrtosiphon pisum*, reared on different diets. *Journal of Experimental Biology*, 1999, **202**(19): 2639-2652.
- Fisher D. B.** Long distance transport. In: *Biochemistry and Molecular Biology of plants* Edited by Buchanan B, Gruissem, W. and Jones, R. Rockville, MD, USA: American Society of Plant Physiologists; 2000: 730-784.
- Fukatsu T., Ishikawa H.** A novel eukaryotic extracellular symbiont in an aphid, *Astegopteryx styraci* (Homoptera, aphididae, hormaphidinae). *J Insect Physiol*, 1992, **38**(10): 765-773.
- Fukatsu T., Aoki S., Kurosu U., Ishikawa H.** Phylogeny of Cerataphidini aphids revealed by their symbiotic microorganisms and basic structure of their galls: implications for host-symbiont coevolution and evolution of sterile soldier castes. *Zoological Science*, 1994, **11**(4): 613-623.
- Futahashi R., Okamoto S., Kawasaki H., Zhong Y. S., Iwanaga M., Mita K., Fujiwara H.** Genome-wide identification of cuticular protein genes in the silkworm, *Bombyx mori*. *Insect Biochem Mol Biol*, 2008, **38**(12): 1138-1146.
- Gallot A., Rispe C., Leterme N., Gauthier J. P., Jaubert-Possamai S., Tagu D.** Cuticular proteins and seasonal photoperiodism in aphids. *Insect Biochem Mol Biol*, 2010, **40**(3): 235-240.
- Gerardo N. M., Altincicek B., Anselme C., Atamian H., Barribeau S. M., de Vos M., Duncan E. J., Evans J. D., Gabaldon T., Ghanim M. et al.** Immunity and other defenses in pea aphids, *Acyrtosiphon pisum*. *Genome Biology*, 2010, **11**(2): R21.
- Gholami M., Coombe B. G., Robinson S. R.** Grapevine Phloem Sap Analysis: 1-Sucrose, Amino Acids, Potassium Concentrations, Seasonal and Diurnal Patterns. *Acta Hort (ISHS)*, 2004, **640**: 143-153.
- Gil R., Sabater-Munoz B., Latorre A., Silva F. J., Moya A.** Extreme genome reduction in *Buchnera* spp.: Toward the minimal genome needed for symbiotic life. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA*, 2002, **99**(7): 4454-4458.
- Gil R., Sabater-Munoz B., Perez-Brocacal V., Silva F. J., Latorre A.** Plasmids in the aphid endosymbiont *Buchnera aphidicola* with the smallest genomes. A puzzling evolutionary story. *Gene*, 2006, **370**: 17-25.
- Giordanengo P., Febvay G., Rahbé Y.** Comment les pucerons manipulent les plantes. *Biofutur*, 2007, **279**: 35-38.
- Girousse C., Bonnemain J. L., Delrot S., Bournoville R.** Sugar and amino acid composition of phloem sap of *Medicago sativa* - A comparative study of two collecting methods. *plant Physiol Biochem*, 1991, **29**: 41-48.
- Girousse C., Moulia B., Silk W., Bonnemain J. L.** Aphid infestation causes different changes in carbon and nitrogen allocation in alfalfa stems as well as different inhibitions of longitudinal and radial expansion. *Plant Physiology*, 2005, **137**(4): 1474-1484.
- Grace T. D. C.** Establishment of 4 strains of cells from insect tissues grown *in vitro*. *Nature*, 1962, **195**: 788-789.
- Gray S. M., Banerjee N.** Mechanisms of arthropod transmission of plant and animal viruses. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 1999, **63**(1): 128-148.

- Greengard O., Yoss M. S., Del Valle J. A.** Alpha-methylphenylalanine, a new inducer of chronic hyperphenylalaninemia in suckling rats. *Science*, 1976, **192**(4243): 1007-1008.
- Hansen A. K., Moran N. A.** Aphid genome expression reveals host-symbiont cooperation in the production of amino acids. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2011, **108**(7): 2849-2854.
- Henderson J. W., Ricker R. D., Bidlingmeyer B. A., Woodward C.** Rapid, accurate, sensitive, and reproducible HPLC analysis of amino acids. Amino acid analysis using Zorbax Eclipse-AAA columns and the Agilent 1100 HPLC. *Agilent Technologies Inc, Publication Number 5980-1193E*, 2000: 1-10.
- Herbeck J. T., Degan P. H., Wernegreen J. J.** Nonhomogeneous Model of Sequence Evolution Indicates Independent Origins of Primary Endosymbionts Within the Enterobacteriales ( $\gamma$ -Proteobacteria). *Molecular Biology and Evolution*, 2005, **22**(3): 520-532.
- Honegger H. W., Dewey E. M., Ewer J.** Bursicon, the tanning hormone of insects: recent advances following the discovery of its molecular identity. *J Comp Physiol A Neuroethol Sens Neural Behav Physiol*, 2008, **194**(12): 989-1005.
- IAGC T.** Genome sequence of the pea aphid *Acyrtosiphon pisum*. *PLoS Biol*, 2010, **8**(2): e1000313.
- Irizarry R. A., Hobbs B., Collin F., Beazer-Barclay Y. D., Antonellis K. J., Scherf U., Speed T. P.** Exploration, normalization, and summaries of high density oligonucleotide array probe level data. *Biostatistics*, 2003, **4**(2): 249-264.
- Ishikawa A., Hongo S., Miura T.** Morphological and histological examination of polyphenic wing formation in the pea aphid *Acyrtosiphon pisum* (Hemiptera, Hexapoda). *Zoology*, 2008, **127**: 121-133.
- Jaubert-Possamai S., Le Trionnaire G., Bonhomme J., Christophides G. K., Rispe C., Tagu D.** Gene knockdown by RNAi in the pea aphid *Acyrtosiphon pisum*. *BMC Biotechnol*, 2007, **7**: 63.
- Johnson B.** Embryonic cuticle in aphids. *Aust J Sci*, 1958, **21**: 146.
- Johnson B., Birks P. R.** Studies on wing polymorphism in aphids. 1. The developmental process involved in the production of the different forms *Entomologia Experimentalis et Applicata*, 1960, **3**: 327-339.
- Johnson B.** Wing polymorphism in aphids. 2. Interaction between aphids. *Entomologia Experimentalis et Applicata*, 1965, **8**: 49-64.
- Karley A. J., Ashford D. A., Minto L. M., Pritchard J., Douglas A. E.** The significance of gut sucrase activity for osmoregulation in the pea aphid, *Acyrtosiphon pisum*. *Journal of Insect Physiology*, 2005, **51**(12): 1313-1319.
- Kochian L. V.** Molecular physiology of mineral nutrient acquisition, transport and utilization. In: *Biochemistry and molecular Biology of plants* Edited by Buchanan B, Gruissem, W. and Jones, R. Rockville, MD, USA: American Society of plant physiologists; 2000: 1204-1249.
- Kubori T., Matsushima Y., Nakamura D., Uralil J., Lara-Tejero M., Sukhan A., Galan J. E., Aizawa S. I.** Supramolecular structure of the *Salmonella typhimurium* type III protein secretion system. *Science*, 1998, **280**(5363): 602-605.

- Lain-Guelbenzu B., Munoz-Blanco J., Cardenas J.** Purification and properties of L-aspartate aminotransferase of *Chlamydomonas reinhardtii*. *Eur J Biochem*, 1990, **188**(3): 529-533.
- Lamelas A., Gosalbes M. J., Moya A., Latorre A.** New clues about the evolutionary history of metabolic losses in bacterial endosymbionts, provided by the genome of *Buchnera aphidicola* from the aphid *Cinara tujafilina*. *Appl Environ Microbiol*, 2011, **77**(13): 4446-4454.
- Lampel G.** Die symbiontischen Einrichtungen im Rahmen des Generationswechsels monzischer und heterzischer Pemphiginen der Schwarzund Pyramidenpappel. *Zeit Morphol O<sup>o</sup> kol Tiere*, 1958, **47**: 403-435.
- Latorre A., Gil R., Silva F. J., Moya A.** Chromosomal stasis versus plasmid plasticity in aphid endosymbiont *Buchnera aphidicola*. *Heredity*, 2005, **95**(5): 339-347.
- Le Trionnaire G., Hardie J., Jaubert-Possamai S., Simon J. C., Tagu D.** Shifting from clonal to sexual reproduction in aphids: physiological and developmental aspects. *Biology of the Cell*, 2008, **100**(8): 441-451.
- Lees A. D.** The production of the apterous and alate forms in the aphid *Megoura viciae* Buckton, with special reference to the role of crowding. *J Insect Physiol*, 1967, **13**: 289-318.
- Liadouze I., Febvay G., Guillaud J., Bonnot G.** Effect of diet on the free amino acid pools of symbiotic and aposymbiotic pea aphids, *Acyrtosiphon pisum*. *J Insect Physiol*, 1995, **41**(1): 33-40.
- Liadouze I., Febvay G., Guillaud J., Bonnot G.** Metabolic fate of energetic amino acids in the aposymbiotic pea aphid *Acyrtosiphon pisum* (Harris) (Homoptera: Aphididae). *Symbiosis*, 1996, **21**: 115-127.
- Lucas W. J., Madore M. A.** Recent advances in sugar transport. In: *The Biochemistry of Plants* Edited by Preiss J, vol. 14. Florida, Orlando: Academic Press; 1988: 35-84.
- Maezawa K., Shigenobu S., Taniguchi H., Kubo T., Aizawa S., Morioka M.** Hundreds of flagellar basal bodies cover the cell surface of the endosymbiotic bacterium *Buchnera aphidicola* sp. strain APS. *Journal of Bacteriology*, 2006, **188**(18): 6539-6543.
- Majander K., Anton L., Antikainen J., Lang H., Brummer M., Korhonen T. K., Westerlund-Wikstrom B.** Extracellular secretion of polypeptides using a modified *Escherichia coli* flagellar secretion apparatus. *Nature Biotechnology*, 2005, **23**(4): 475-481.
- Manganelli R., Dubnau E., Tyagi S., Kramer F. R., Smith I.** Differential expression of 10 sigma factor genes in *Mycobacterium tuberculosis*. *Mol Microbiol*, 1999, **31**(2): 715-724.
- Markkula M., Rautapää J.** The effect of light and temperature on the colour of the English grain aphid, *Macrosiphum avenae* (F.) (Hom., Aphididae). *Annales Entomologici Fennici*, 1967, **33**: 1-13.
- Marschner H., Kirkby E. A., Cakmak I.** Effect of mineral nutritional status on shoot-root partitioning of photoassimilates and cycling of mineral nutrients *J Exp Bot*, 1996, **47**: 1255-1263.
- McLean D. L., Kinsey M. G.** A technique for electronically recording aphid feeding and salivation *Nature*, 1964, **202**: 1358-1359.

- Miles P. W.** The responses of plants to the feeding of Aphidoidea: principles. In: *Aphids their biology, natural enemies and control*. Edited by Minks AK, Harrewijn, P., vol. 2C: Elsevier; 1989: 1-21.
- Miles P. W.** Aphid saliva. *Biological reviews*, 1999, **74**(1): 41-85.
- Mira A., Moran N. A.** Estimating population size and transmission bottlenecks in maternally transmitted endosymbiotic bacteria. *Microb Ecol*, 2002, **44**(2): 137-143.
- Mittler T. E., Dadd R. H.** Differences in the probing responses of *Myzus persicae* (Sulzer) elicited by different feeding solutions behind a Parafilm membrane. *Entomologia Experimentalis et Applicata*, 1965, **8**: 107-122.
- Mittler T. E.** Some effects on the aphid *Myzus persicae* of ingesting antibiotics incorporated into artificial diets. *J Insect Physiol*, 1971, **17**: 1333-1347.
- Mittler T. E., Meikle T.** Effects of Dietary Sucrose Concentration on Aphid Honeydew Carbohydrate Levels and Rates of Excretion. *Entomologia Experimentalis et Applicata*, 1991, **59**: 1-7.
- Miura T., Braendle C., Shingleton A., Sisk G., Kambhampati S., Stern D. L.** A comparison of parthenogenetic and sexual embryogenesis of the pea aphid *Acyrtosiphon pisum* (Hemiptera: Aphidoidea). *J exp Zool*, 2003, **295B**(1): 59-81.
- Moran N. A.** The Evolution of Aphid Life Cycles. *Annual Review of Entomology*, 1992, **37**: 321-348.
- Moran N. A., Munson M. A., Baumann P., Ishikawa H.** A molecular clock in endosymbiotic bacteria is calibrated using the insect hosts. *Proceedings of the Royal Society of London, Series B Biological Sciences*, 1993, **253**(1337): 167-171.
- Moran N. A., Baumann P.** Phylogenetics of cytoplasmically inherited microorganisms of arthropods. *Trends in Ecology and Evolution*, 1994, **9**(1): 15-20.
- Moran N. A., Mira A.** The process of genome shrinkage in the obligate symbiont *Buchnera aphidicola*. *Genome Biology*, 2001, **2**(12): 54.51-54.12.
- Moran N. A., McLaughlin H. J., Sorek R.** The dynamics and time scale of ongoing genomic erosion in symbiotic bacteria. *Science*, 2009, **323**(5912): 379-382.
- Müller C. B., Williams I. S., Hardie J.** The role of nutrition, crowding and interspecific interactions in the development of winged aphids. *Ecological Entomology*, 2001, **26**(3): 330-340.
- Müller F. P.** Biotypen und unterarten der "Erbsenlaus" *Acyrtosiphon pisum* Harris. *Zeitschrift für Pflanzenkrankheiten*, 1962, **69**: 129-136.
- Müller F. P., Kabisch U., Reiher H.** Unterscheidungsmerkmale der grünstreifigen kartoffelblattlaus *Macrosiphum euphorbiae* (Thomas) und der erbsenblattlaus *Acyrtosiphon pisum* (Harris). *Archiv für Phytopathologie und Pflanzenschutz*, 1974, **10**: 197-209.
- Müller F. P.** Eine gelbe mutante der schwarzen blattlaus *Aphis fabae cirsiacanthoidis scopoli* und bastardierungsversuche. *Biologie Zentralbibliothek*, 1979, **104**: 225-237.

- Müller F. P.** Faunistish-okologische untersuchungen uber aphiden im westlichen Erzgebirge und Vogtland. *Faunistische Abhandlungen Staatliches Museum für Tierkunde Dresden*, 1987, **14**: 105-129.
- Munson M. A., Baumann P., Kinsey M. G.** Buchnera gen. nov. and *Buchnera aphidicola* sp. nov., a Taxon Consisting of the Mycetocyte-Associated, Primary Endosymbionts of Aphids. *International Journal of Systematic Bacteriology*, 1991a, **41**(4): 566-568.
- Munson M. A., Baumann P., Clark M. A., Baumann L., Moran N. A., Voegtlin D. J., Campbell B. C.** Evidence for the establishment of aphid-eubacterium endosymbiosis in an ancestor of four aphid families. *Journal of Bacteriology*, 1991b, **173**(20): 6321-6324.
- Mutti N. S., Park Y., Reese J. C., Reeck G. R.** RNAi knockdown of a salivary transcript leading to lethality in the pea aphid, *Acyrtosiphon pisum*. *J Insect Sci*, 2006, **6**: 1-7.
- Mutti N. S., Louis J., Pappan L. K., Pappan K., Begum K., Chen M. S., Park Y., Dittmer N., Marshall J., Reese J. C. et al.** A protein from the salivary glands of the pea aphid, *Acyrtosiphon pisum*, is essential in feeding on a host plant. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2008, **105**(29): 9965-9969.
- Nakabachi A., Shigenobu S., Sakazume N., Shiraki T., Hayashizaki Y., Carninci P., Ishikawa H., Kudo T., Fukatsu T.** Transcriptome analysis of the aphid bacteriocyte, the symbiotic host cell that harbors an endocellular mutualistic bacterium, *Buchnera*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2005, **102**(15): 5477-5482.
- Nault L. R.** Arthropod transmission of plant viruses: A new synthesis. *Annals of the Entomological Society of America*, 1997, **90**(5): 521-541.
- Nijhout H. F.** Control mechanism of polyphenic development in insects. *Bioscience* 1999, **49**: 181-192.
- Nuwaysir E. F., Huang W., Albert T. J., Singh J., Nuwaysir K., Pitas A., Richmond T., Gorski T., Berg J. P., Ballin J. et al.** Gene expression analysis using oligonucleotide arrays produced by maskless photolithography. *Genome Res*, 2002, **12**(11): 1749-1755.
- Orlando E., Crema R.** Differenziamento del germario anfigonico e partenogenetico di *Megoura viciae* (Homoptera: Aphididae). *Bolletino di Zoologica*, 1968, **36**: 225-229.
- Perez-Brocal V., Gil R., Ramos S., Lamelas A., Postigo M., Michelena J. M., Silva F. J., Moya A., Latorre A.** A small microbial genome: the end of a long symbiotic relationship? *Science*, 2006, **314**(5797): 312-313.
- Pfaffl M. W.** A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Res*, 2001, **29**(9): e45.
- Pfaffl M. W., Horgan G. W., Dempfle L.** Relative expression software tool (REST) for group-wise comparison and statistical analysis of relative expression results in real-time PCR. *Nucleic Acids Res*, 2002, **30**(9): e36.
- Pfaffl M. W., Tichopad A., Prgomet C., Neuvians T. P.** Determination of stable housekeeping genes, differentially regulated target genes and sample integrity: BestKeeper--Excel-based tool using pair-wise correlations. *Biotechnol Lett*, 2004, **26**(6): 509-515.
- Poliakov A., Russell C. W., Ponnala L., Hoops H. J., Sun Q., Douglas A. E., van Wijk K. J.** Large-scale label-free quantitative proteomics of the pea aphid-*Buchnera* symbiosis. *Molecular & cellular proteomics : MCP*, 2011.



- Ponsen M. B.** Alimentary tract In: *Aphids: Their Biology, Natural Enemies and Control*. Edited by Minks AK, Harrewijn, P. Amsterdam: Elsevier; 1987: 79-97.
- Powell G.** Intracellular salivation is the aphid activity associated with inoculation of non-persistently transmitted viruses. *Journal of General Virology*, 2005, **86**: 469-472.
- Powell G., Tosh C. R., Hardie J.** Host Plant Selection by Aphids: Behavioral, Evolutionary, and Applied Perspectives. *Annual Review of Entomology*, 2006, **51**: 309-330.
- Price D. R. G., Duncan R. P., Shigenobu S., C. W. A. C.** Genome expansion and differential expression of amino acid transporters at the aphid/*Buchnera* symbiotic interface. *Molecular Biology and Evolution*, 2011.
- Prickett M. D., Page M., Douglas A. E., Thomas G. H.** BuchneraBASE: a post-genomic resource for *Buchnera* sp. APS. *Bioinformatics*, 2006, **22**(5): 641-642.
- Prosser W. A., Simpson S. J., Douglas A. E.** How an aphid symbiosis responds to variation in dietary nitrogen. *J Insect Physiol*, 1992a, **38**(4): 301-307.
- Prosser W. A., Douglas A. E.** A test of the hypotheses that nitrogen is upgraded and recycled in an aphid (*Acyrtosiphon pisum*) symbiosis. *J Insect Physiol*, 1992b, **38**(2): 93-99.
- Rahbé Y., Bonnot G.** La gestion des acides aminés aromatiques chez les Lépidoptères. *Canadian Journal of Zoology*, 1986, **64**(7): 1385-1399.
- Rahbé Y., Febvay G., Delobel B., Bournoville R.** *Acyrtosiphon pisum* performance in response to the sugar and amino acid composition of artificial diets, and its relation to lucerne varietal resistance. *Entomologia Experimentalis et Applicata*, 1988, **48**(3): 283-292.
- Rahbé Y., Febvay G., Delobel B., Bonnot G.** Amino acids and proteins as cues in interactions of aphids (Homoptera: Aphididae) and plants. In: *Principles and Applications of Electronic Monitoring and Other Techniques in the Study of Homopteran Feeding Behavior*. Edited by Walker GP, Backus EA. USA: Thomas Say Publications in Entomology; 2000: 212-236.
- Retnakaran A., Beck S. D.** Aminoacid requirements and sulfur aminoacid metabolism in the pea aphid, *Acyrtosiphon pisum*. *Comparative Biochemistry and Physiology*, 1967, **24**: 611-619.
- Reymond N., Calevro F., Vinuelas J., Morin N., Rahbe Y., Febvay G., Laugier C., Douglas A., Fayard J. M., Charles H.** Different levels of transcriptional regulation due to trophic constraints in the reduced genome of *Buchnera aphidicola* APS. *Appl Environ Microbiol*, 2006, **72**(12): 7760-7766.
- Rhodes J. D., Croghan P. C., Dixon A. F. G.** Uptake, excretion and respiration of sucrose and amino acids by the pea aphid *Acyrtosiphon pisum*. *Journal of Experimental Biology*, 1996, **199**(6): 1269-1276.
- Rose W. C., Oesterling M. J., Womack M.** Comparative growth on diets containing ten and nineteen amino acids, with further observations on the role of glutamic and aspartic acids. *J Biol Chem*, 1948, **176**: 753-762.
- Rychlik W.** OLIGO 7 primer analysis software. *Methods Mol Biol*, 2007, **402**: 35-60.
- Sabater-Muñoz B., Legeai F., Risper C., Bonhomme J., Dearden P., Dossat C., Duclert A., Gauthier J.-P., Giblot Ducray D., Hunter W. et al.** Large-scale gene discovery in the pea aphid *Acyrtosiphon pisum* (Hemiptera). *Genome Biology*, 2006, **7**(R21): 1-11.

- Saier M.** Families of transmembrane transporters selective for amino acids and their derivatives. *Microbiol Sgm*, 2000, **146**: 1775-1795.
- Sander K.** Morphogenetic movements in insect embryogenesis. In: *Insect development*. Edited by Lawrence PA LP: Symposia of the royal entomological society of London, New York: John Wiley & Sons.; 1976.
- Sandstrom J. P., Pettersson J.** Amino acid composition of phloem sap and relation to intraspecific variation in pea aphid (*Acyrtosiphon pisum*) performance. *J Insect Physiol*, 1994, **40**: 947-955.
- Sandstrom J. P., Russell J. A., White J. P., Moran N. A.** Independent origins and horizontal transfer of bacterial symbionts of aphids. *Molecular Ecology*, 2001, **10**(1): 217-228.
- Sasaki T., Hayashi H., Ishikawa H.** Growth and reproduction of the symbiotic and aposymbiotic pea aphids, *Acyrtosiphon pisum* maintained on artificial diets. *J Insect Physiol*, 1991, **37**(10): 749-756.
- Sasaki T., Ishikawa H.** Nitrogen recycling in the endosymbiotic system of the pea aphid, *Acyrtosiphon pisum*. *Zoological Science*, 1993, **10**(5): 779-785.
- Sasaki T., Ishikawa H.** Production of essential amino acids from glutamate by mycetocyte symbionts of the pea aphid, *Acyrtosiphon pisum*. *J Insect Physiol*, 1995, **41**(1): 41-46.
- Shakesby A. J., Wallace I. S., Isaacs H. V., Pritchard J., Roberts D. M., Douglas A. E.** A water-specific aquaporin involved in aphid osmoregulation. *Insect Biochem Mol Biol*, 2009, **39**(1): 1-10.
- Sharkey P. J., Pate J. S.** Translocation from leaves to fruits of a legume, studied by a phloem bleeding technique: diurnal changes and effects of continuous darkness. *Planta*, 1976, **128**: 63-72.
- Shaw M. J. P.** Effects of population density on alienicolae of *Aphis fabae* Scop.I. The effect of crowding on the production of alatae in the laboratory. *Annals of Applied Biology*, 1970, **65**: 191-196.
- Shigenobu S., Watanabe H., Hattori M., Sakaki Y., Ishikawa H.** Genome sequence of the endocellular bacterial symbiont of aphids *Buchnera* sp. APS. *Nature*, 2000, **407**(6800): 81-86.
- Shigenobu S., Bickel R. D., Brisson J. A., Butts T., Chang C. c., Christiaens O., Davis G. K., Duncan E. J., Ferrier D. E. K., Iga M. et al.** Comprehensive survey of developmental genes in the pea aphid, *Acyrtosiphon pisum*: frequent lineage-specific duplications and losses of developmental genes. *Insect Mol Biol*, 2010, **19**: 47-62.
- Simon J.-C.** Des pucerons avec ou sans ailes. *Biofutur*, 2007a, **279**: 48.
- Simon J.-C., Jaubert S., Rispe C., Tagu D.** La vie sexuées et asexuée des pucerons. *Biofutur*, 2007, **279**: 53-56.
- Simon J.-C.** Quand les pucerons sociabilisent. *Biofutur*, 2007b, **279**: 39.
- Simon J. C., Rispe C., Sunnucks P.** Ecology and evolution of sex in aphids. *Trends in Ecology and Evolution*, 2002, **17**(1): 34-39.
- Simon J. C., Carre S., Boutin M., Prunier-Leterme N., Sabater-Mun B., Latorre A., Bournoville R.** Host-based divergence in populations of the pea aphid: insights from

- nuclear markers and the prevalence of facultative symbionts. *Proceedings of the Royal Society of London, Series B Biological Sciences*, 2003, **270**(1525): 1703-1712.
- Smith J. A. C., Miburn J. A.** Phloem transport, Solute flux and the kinetics of sap exudation in *Ricinus communis* L. *Planta*, 1980, **148**: 35-41.
- Smyth G. K.** Linear models and empirical bayes methods for assessing differential expression in microarray experiments. *Statistical applications in genetics and molecular biology*, 2004, **3**: Article3.
- Sutherland O. R. W.** The role of crowding in the production of wing forms by two strains of the pea aphid, *Acyrtosiphon pisum*. *J Insect Physiol*, 1969a, **15**: 1385-1410.
- Sutherland O. R. W.** The role of the host plant in the production of winged forms by strains of the pea aphid, *Acyrtosiphon pisum*. *J Insect Physiol*, 1969b, **15**: 2179-2201.
- Szklarzewicz T., Wnek A., Bilinski S. M.** Structure of ovarioles in *Adelges laricis* , a representative of the primitive aphid family Adelgidae. *Acta Zoologica*, 2000, **81**: 307-313.
- Takahashi R.** Aphididae of Formosa III, vol. 10: Report of the Government Research Institute, Formosa Department of Agriculture; 1924a.
- Takahashi R.** On the nymphs of Aphidinae *Proceedings of the Entomological Society of Washington*, 1924b, **26**: 1-11.
- Tamas I., Klasson L., Canback B., Naslund A. K., Eriksson A. S., Wernegreen J. J., Sandstrom J. P., Moran N. A., Andersson S. G.** 50 million years of genomic stasis in endosymbiotic bacteria. *Science*, 2002, **296**(5577): 2376-2379.
- Tjallingii W. F.** Electronic recording of penetration behaviour by aphids. *Entomologia Experimentalis et Applicata*, 1978, **24**: 521-530.
- Tjallingii W. F.** Wire effects on aphids during electrical recording of stylet penetration. *Entomologia Experimentalis et Applicata*, 1986, **40**: 89-98.
- Toft C., Fares M. A.** The Evolution of the Flagellar Assembly Pathway in Endosymbiotic Bacterial Genomes. *Molecular Biology and Evolution*, 2008, **25**(9): 2069-2076.
- Tomii K., Kanehisa M.** A comparative analysis of ABC transporters in complete microbial genomes. *Genome Res*, 1998, **8**(10): 1048-1059.
- Trager W.** Symbiosis. New York: Van Nostrand; 1970.
- Tse C., Capeau J.** [Real time PCR methodology for quantification of nucleic acids]. *Ann Biol Clin (Paris)*, 2003, **61**(3): 279-293.
- Tsuchida T., Koga R., Mitsuyo H., T. T., Maoka T., Matsumoto S., Simon J. C., Fukatsu T.** Symbiotic bacterium modifies aphid body color. *Science*, 2011, **330**: 1102-1104.
- Tsuji H., Kawada K.** Development and degeneration of wing dubs and indirect flight muscles in the pea aphid (*Acyrtosiphon pisum* (Harris)). *Jpn J Appl Entomol Zool*, 1987, **31**: 247-252.
- van Ham R. C., Kamerbeek J., Palacios C., Rausell C., Abascal F., Bastolla U., Fernandez J. M., Jimenez L., Postigo M., Silva F. J. et al.** Reductive genome evolution in *Buchnera aphidicola*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA*, 2003, **100**(2): 581-586.
- Vellozo A. F., Veron A. S., Baa-Puyoulet P., Huerta-Cepas J., Cottret L., Febvay G., Calevro F., Rahbe Y., Douglas A. E., Gabaldon T. et al.** CycADS: an annotation database system

- to ease the development and update of BioCyc databases. *Database (Oxford)*, 2011, **2011**: bar008.
- Vinuelas J., Febvay G., Duport G., Colella S., Fayard J. M., Charles H., Rahbe Y., Calevro F.** Multimodal dynamic response of the *Buchnera aphidicola* pLeu plasmid to variations in leucine demand of its host, the pea aphid *Acyrtosiphon pisum*. *Mol Microbiol*, 2011, **81**(5): 1271-1285.
- Viñuelas J., Calevro F., Remond D., Bernillon J., Rahbé Y., Febvay G., Fayard J. M., Charles H.** Conservation of the links between gene transcription and chromosomal organization in the highly reduced genome of *Buchnera aphidicola*. *BMC Genomics*, 2007, **8**: 143.
- Von Dohlen C. D., Moran N. A.** Molecular data support a rapid radiation of aphids in the Cretaceous and multiple origins of host alternation. *Biological Journal of the Linnean Society*, 2000, **71**: 689-717.
- Wernegreen J. J.** Genome evolution in bacterial endosymbionts of insects. *Nat Rev Genet*, 2002, **3**(11): 850-861.
- Whyard S., Singh A. D., Wong S.** Ingested double-stranded RNAs can act as species-specific insecticides. *Insect Biochem Mol Biol*, 2009, **39**(11): 824-832.
- Wilkinson T. L., Douglas A. E.** The impact of aposymbiosis on amino acid metabolism of pea aphids. *Entomologia Experimentalis et Applicata*, 1996, **80**(1): 279-282.
- Wilkinson T. L., Ishikawa H.** The assimilation and allocation of nutrients by symbiotic and aposymbiotic pea aphids, *Acyrtosiphon pisum*. *Entomologia Experimentalis et Applicata*, 1999, **91**(1): 195-201.
- Wilkinson T. L., Ishikawa H.** Injection of essential amino acids substitutes for bacterial supply in aposymbiotic pea aphids (*Acyrtosiphon pisum*). *Entomologia Experimentalis et Applicata*, 2000, **94**(1): 85-91.
- Wilkinson T. L., Fukatsu T., Ishikawa H.** Transmission of symbiotic bacteria *Buchnera* to parthenogenetic embryos in the aphid *Acyrtosiphon pisum* (Hemiptera: Aphidoidea). *Arthropod Struct Dev*, 2003, **32**: 241-245.
- Wilson A. C., Ashton P. D., Calevro F., Charles H., Colella S., Febvay G., Jander G., Kushlan P. F., Macdonald S. J., Schwartz J. F. et al.** Genomic insight into the amino acid relations of the pea aphid, *Acyrtosiphon pisum*, with its symbiotic bacterium *Buchnera aphidicola*. *Insect Mol Biol*, 2010, **19 Suppl 2**: 249-258.
- Winter H., Lohaus G., Heldt H. W.** Phloem Transport of Amino Acids in Relation to their Cytosolic Levels in Barley Leaves. *Plant Physiol*, 1992, **99**(3): 996-1004.
- Wool D.** Gallig aphids: specialization, biological complexity, and variation. *Annual Review of Entomology*, 2004, **49**: 175-192.
- Yagi T., Shounaka M., Yamamoto S.** Distribution of aspartate-aminotransferase activity in yeasts, and purification and characterization of mitochondrial and cytosolic isoenzymes from *Rhodotorula marina*. *J Biochem*, 1990, **107**: 151-159.
- Young G. B., Jack D. L., Smith D. W., Saier M. H.** The amino acid/auxin : proton symport permease family. *Biochimica Et Biophysica Acta-Biomembranes*, 1999a, **1415**: 306-322.

- Young G. B., Smith M. J., Minnich V. L.** The *Yersinia enterocolitica* motility master regulatory operon, flhDC, is required for flagelling production, swimming motility, and swarming motility. *Journal of Bacteriology*, 1999b, **181**(9): 2823-2833.
- Zhou J. J., Vieira F. G., He X. L., Smadja C., Liu R., Rozas J., Field L. M.** Genome annotation and comparative analyses of the odorant-binding proteins and chemosensory proteins in the pea aphid *Acyrtosiphon pisum*. *Insect Mol Biol*, 2010, **19 Suppl 2**: 113-122.
- Ziegler H.** Nature of transported substances. In: *Encyclopedia of plant physiology*. Edited by PIRSON A. ZMHE, vol. 1. Berlin (GER): Springer Verlag; 1975: 59-100.
- Zientz E., Dandekar T., Gross R.** Metabolic interdependence of obligate intracellular bacteria and their insect hosts. *Microbiol Mol Biol Rev*, 2004, **68**(4): 745-770.

# Annexes



**Tableau S1. Gènes liés au développement chez le puceron du pois (Shigenobu *et al.*, 2010) et différentiellement exprimés au cours du développement.**

Pour chaque gène et pour chacune des comparaisons significatives, la différence d'expression (différence des expressions exprimées en log<sub>2</sub>) est indiquée.

**A) Liste des gènes variant significativement d'expression dans la comparaison EE-IE.**

	Gène	Différence d'expression	Nom du gène	
			Symbole	Description
<b>Gènes augmentant d'expression dans la comparaison EE-IE</b>	ACYPI009996-RA	2.36	<i>frc2</i>	fringe connection 2
	ACYPI001533-RA	2.00	<i>PKCd</i>	Protein Kinase C delta
	ACYPI001990-RA	1.86	<i>spz6</i>	spatzle 6
	ACYPI000969-RA	1.84	<i>Tm2</i>	Tropomyosin 2
	ACYPI008454-RA	1.64	<i>pip</i>	pipe
	ACYPI008092-RA	1.62	<i>Hr4</i>	Hr4, NR6A2
	ACYPI005682-RA	1.62	<i>Exex</i>	Extra extra
	ACYPI23897-RA	1.6	<i>wun2</i>	wunen 2
	ACYPI45604-RA	1.37	<i>Pph13</i>	Pph13
	ACYPI008074-RA	1.27	<i>FGF1</i>	fibroblast growth factor 1
	ACYPI49127-RA	1.2	<i>Myo2</i>	myostatin 2
	ACYPI33281-RA	1.16	<i>Krn</i>	Keren
	ACYPI009492-RA	1.16	<i>ndl</i>	nudel
	ACYPI010036-RA	1.14	<i>NfI</i>	Nuclear factor I homolog
<b>Gènes diminuant d'expression dans la comparaison EE-IE</b>	ACYPI48102-RA	-1.02	<i>Hr83</i>	Hr83, NR2E5
	ACYPI006704-RA	-1.02	<i>vas3</i>	vasa 3, Apvasa3
	ACYPI008450-RA	-1.02	<i>Med2</i>	Medea 2, SMAD4
	ACYPI006800-RA	-1.16	<i>Lmxa</i>	Lmxa
	ACYPI001448-RA	-1.2	<i>twi</i>	twist
	ACYPI28321-RA	-1.38	<i>Msx1x</i>	Msx1x
	ACYPI009598-RA	-1.4	<i>Dpp2</i>	decapentaplegic 2
	ACYPI003536-RA	-1.41	<i>Gsc</i>	Goosecoid
	ACYPI29702-RA	-1.51	<i>Otp</i>	Otp
	ACYPI010017-RA	-1.53	<i>bib</i>	big brain
	ACYPI009127-RA	-1.64	<i>Dpp3</i>	decapentaplegic 3
	ACYPI001215-RA	-1.68	<i>run</i>	runt
	ACYPI53591-RA	-1.9	<i>Tin</i>	Tinman
	ACYPI007337-RA	-1.93	<i>Lmxb</i>	Lmxb
	ACYPI37791-RA	-2.28	<i>ftz</i>	ftz
ACYPI43755-RA	-2.42	<i>ind</i>	intermediate neuroblasts defective	



## B) Liste des gènes variant significativement dans la comparaison IE-LE

	Gène	Différence d'expression	Nom du gène	
			Symbole	Description
<b>Gènes augmentant d'expression dans la comparaison IE-LE</b>	ACYPI002943-RA	3.36	<i>Idax</i>	inhibition of Dvl/Axin Complex
	ACYPI40957-RA	2.67	<i>Dome4</i>	domeless 4
	ACYPI000135-RA	2.53	<i>kek4</i>	kekkon 4
	ACYPI000849-RA	2.27	<i>blimp1</i>	blimp1
	ACYPI000177-RA	2.08	<i>Tl</i>	Tall
	ACYPI21996-RA	1.35	<i>Dome3</i>	domeless 3
	ACYPI55738-RA	1.18	<i>spz3</i>	spatzle 3
	ACYPI003334-RA	1.16	<i>Rho5</i>	Rhomoboid 5
<b>Genes diminuant d'expression dans la comparaison IE-LE</b>	ACYPI43755-RA	-1	<i>ind</i>	intermediate neuroblasts defective
	ACYPI009753-RA	-1.01	<i>Prop</i>	Prop
	ACYPI002484-RA	-1.01	<i>hyx</i>	Hyrax, Parafibromin, CDC73
	ACYPI010124-RA	-1.01	<i>Mad2</i>	Mothers against dpp 2, SMAD
	ACYPI009025-RA	-1.03	<i>l(2)gl</i>	lethal (2) giant discs 1
	ACYPI27691-RA	-1.03	<i>Pdm3</i>	Pdm3
	ACYPI003531-RA	-1.05	<i>Wnt5</i>	Wnt5
	ACYPI009075-RA	-1.06	<i>Exd</i>	Extradenticle
	ACYPI001204-RA	-1.06	<i>WntA</i>	WntA
	ACYPI000749-RA	-1.08	<i>Gbb</i>	glass bottom boat
	ACYPI009409-RA	-1.09	<i>Hnf4</i>	Hnf4, NR2A4
	ACYPI002376-RA	-1.13	<i>disp</i>	dispatched
	ACYPI008789-RA	-1.15	<i>dally3</i>	dally-like 3
	ACYPI009061-RA	-1.18	<i>EGFR</i>	epidermal growth factor receptor
	ACYPI008285-RA	-1.19	<i>nct</i>	nicastrin
	ACYPI001990-RA	-1.19	<i>spz6</i>	spatzle 6
	ACYPI003976-RA	-1.2	<i>fz2</i>	frizzled 2
	ACYPI002157-RA	-1.22	<i>dx</i>	deltex
	ACYPI28321-RA	-1.24	<i>Msx1x</i>	Msx1x
	ACYPI20476-RA	-1.29	<i>Myo1</i>	myostatin 1
	ACYPI28184-RA	-1.3	<i>FGF8-like</i>	FGF8-like
	ACYPI001215-RA	-1.3	<i>run</i>	runt
	ACYPI34460-RA	-1.33	<i>vg</i>	vestigial
	ACYPI009360-RA	-1.33	<i>tll</i>	tailless
	ACYPI003637-RA	-1.33	<i>Ser</i>	Serrate
	ACYPI001225-RA	-1.35	<i>Su(H)-1</i>	suppressor of hairless 1
	ACYPI000963-RA	-1.36	<i>Rx</i>	Rx
	ACYPI005150-RA	-1.38	<i>N</i>	Notch
	ACYPI003909-RA	-1.38	<i>Hr38</i>	Hr38, NR4A1
	ACYPI004268-RA	-1.42	<i>argos1</i>	argos 1
	ACYPI002171-RA	-1.43	<i>Tup</i>	Tailup
	ACYPI000844-RA	-1.46	<i>sca</i>	scabrous
	ACYPI000398-RA	-1.47	<i>Lim1</i>	Lim1
	ACYPI002874-RA	-1.49	<i>En</i>	homeobox protein engrailed
ACYPI000502-RA	-1.51	<i>ap1</i>	apterous 1; LIM homeobox protein 2/9	
ACYPI006466-RA	-1.52	<i>Ara</i>	Araucan	
ACYPI001981-RA	-1.53	<i>DI</i>	Delta	
ACYPI29702-RA	-1.54	<i>Otp</i>	Otp	

ACYPI004037-RA	-1.57	<i>heph</i>	hephaestus
ACYPI45156-RA	-1.59	<i>ci</i>	cubitus interruptus
ACYPI008452-RA	-1.62	<i>dac</i>	dachshund
ACYPI006811-RA	-1.67	<i>spz4</i>	spatzle 4
ACYPI009852-RA	-1.67	<i>mirr</i>	mirror
ACYPI003064-RA	-1.69	<i>ovo</i>	ovo
ACYPI006661-RA	-1.7	<i>Ems</i>	empty spiracles
ACYPI47548-RA	-1.7	<i>brk</i>	brinker
ACYPI002307-RA	-1.74	<i>E78</i>	E78, NR1E1
ACYPI003414-RA	-1.76	<i>spz2</i>	spatzle 2
ACYPI001856-RA	-1.79	<i>Ubx</i>	ultrabithorax
ACYPI002099-RA	-1.85	<i>fng</i>	fringe
ACYPI000143-RA	-1.86	<i>Omb</i>	Optomotor-blind
ACYPI000498-RA	-1.94	<i>Unc4</i>	Unc4
ACYPI009737-RA	-1.94	<i>HLHgamma2</i>	E(spl) region transcript mgamma 2
ACYPI009481-RA	-2.04	<i>Wnt7</i>	Wnt7
ACYPI003251-RA	-2.04	<i>wg</i>	wingless, Wnt1
ACYPI001196-RA	-2.05	<i>fd96C</i>	forkhead 96C
ACYPI49096-RA	-2.1	<i>Knrl-1</i>	knirps-like 1
ACYPI004907-RA	-2.27	<i>Gsb</i>	gooseberry; paired box protein 3/7
ACYPI005498-RA	-1.52	<i>dally</i>	Division abnormally delayed

## C) Liste des gènes variant significativement dans la comparaison LE-L1

	Gène	Différence d'expression	Nom du gène	
			Symbole	Description
<b>Gènes augmentant d'expression dans la comparaison LE-L1</b>	ACYPI007244-RA	3.14	<i>snk</i>	protease snake
	ACYPI001856-RA	2.22	<i>Ubx</i>	ultrabithorax
	ACYPI001400-RA	2.15	<i>so</i>	sine oculis
	ACYPI002307-RA	1.85	<i>E78</i>	E78, NR1E1
	ACYPI49127-RA	1.8	<i>Myo2</i>	myostatin 2
	ACYPI008722-RA	1.75	<i>Hth</i>	homothorax
	ACYPI006525-RA	1.6	<i>Hh</i>	hedgehog
	ACYPI008452-RA	1.6	<i>dac</i>	dachshund
	ACYPI008273-RA	1.53	<i>Hs3st-B</i>	Heparan sulfate 3-O sulfotransferase-B
	ACYPI45156-RA	1.49	<i>ci</i>	cubitus interruptus
	ACYPI009481-RA	1.47	<i>Wnt7</i>	Wnt7
	ACYPI49096-RA	1.46	<i>Knrl-1</i>	knirps-like 1
	ACYPI009737-RA	1.4	<i>HLH gamma2</i>	E(spl) region transcript mgamma 2
	ACYPI003123-RA	1.28	<i>Tslr</i>	torso-like related
	ACYPI003909-RA	1.25	<i>Hr38</i>	Hr38, NR4A1
	ACYPI000177-RA	1.18	<i>Tl</i>	Tall
	ACYPI008789-RA	1.11	<i>dally3</i>	dally-like 3
	ACYPI008356-RA	1.08	<i>axin</i>	axin
<b>Gènes diminuant d'expression dans la comparaison LE-L1</b>	ACYPI009428-RA	-1.01	<i>RAP2</i>	RAS Associated Protein 2
	ACYPI004842-RA	-1.09	<i>FGFR2</i>	FGFR2
	ACYPI005642-RA	-1.1	<i>STAT2</i>	Signal-transducer and activator of transcription 2
	ACYPI007895-RA	-1.11	<i>fd59A</i>	forkhead 59A
	ACYPI001858-RA	-1.12	<i>spz1-2</i>	spatzle 1-2
	ACYPI001067-RA	-1.23	<i>gcm</i>	glial cell missing
	ACYPI001026-RA	-1.26	<i>Scro</i>	Scarecrow
	ACYPI004234-RA	-1.26	<i>Hr78</i>	Hr78, NR2D1
	ACYPI55738-RA	-1.28	<i>spz3</i>	spatzle 3
	ACYPI002776-RA	-1.3	<i>Star</i>	Star
	ACYPI21996-RA	-1.31	<i>Dome3</i>	domeless 3
	ACYPI007240-RA	-1.34	<i>sim</i>	single-minded
	ACYPI009996-RA	-1.4	<i>frc2</i>	fringe connection 2
	ACYPI005673-RA	-1.42	<i>BicD</i>	Bicaudal D
	ACYPI005934-RA	-1.43	<i>USP</i>	Ultraspiracle, NR2B4
	ACYPI009492-RA	-1.53	<i>ndI</i>	nudel
	ACYPI009165-RA	-1.58	<i>spz-like</i>	spatzle-like
	ACYPI006937-RA	-1.6	<i>lz</i>	lozenge
	ACYPI006797-RA	-1.61	<i>bun</i>	bunched
	ACYPI000629-RA	-1.68	<i>CycE</i>	Cyclin E
	ACYPI24156-RA	-1.7	<i>pnt</i>	ETS-like protein pointed
	ACYPI007352-RA	-1.91	<i>Me31B</i>	Me31B
	ACYPI008092-RA	-2.05	<i>Hr4</i>	Hr4, NR6A2
	ACYPI001392-RA	-2.16	<i>gus</i>	gustavus
	ACYPI000849-RA	-3.26	<i>blimp1</i>	blimp1
	ACYPI002943-RA	-4.12	<i>Idax</i>	Inhibition of Dvl/Axin Complex

**Tableau S2. Gènes liés à la biosynthèse et à la dégradation des acides aminés chez le puceron du pois (d'après Wilson *et al.*, 2010), différemment exprimés au cours du développement.** Pour chaque gène et pour chacune des comparaisons significatives, la différence d'expression (différence des expressions exprimées en log<sub>2</sub>) est indiquée soit en rouge (augmentation significative d'expression) soit en bleu (diminution significative d'expression).

**A) Liste des gènes différentiels appartenant aux familles biosynthétiques des acides aminés.**

Les gènes sont classés en fonction des précurseurs utilisés pour la biosynthèse des acides aminés.

***Aspartate biosynthetic family***

(aspartic acid, asparagine, methionine and cysteine, threonine, isoleucine, lysine)

Gene ID	EE-IE	IE-LE	LE-L1	EC	BRENDA enzyme name
ACYPI006025-RA			1.01	2.3.1.12	dihydrolipoyllysine-residue acetyltransferase
ACYPI004243-RA		2.37	2.91	2.6.1.1	aspartate transaminase
ACYPI006616-RA		1.11		6.3.4.4	adenylosuccinate synthase

***Phosphoenolpyruvate biosynthetic family***

(phenylalanine, tyrosine, tryptophan)

Gene ID	EE-IE	IE-LE	LE-L1	EC	BRENDA enzyme name
ACYPI007803-RA		3.36		1.14.16.1	phenylalanine 4-monooxygenase
ACYPI004243-RA		2.37	2.91	2.6.1.1	aspartate transaminase

***α-ketoglutarate family***

(glutamic acid, glutamine, proline, arginine)

Gene ID	EE-IE	IE-LE	LE-L1	EC	BRENDA enzyme name
ACYPI008912-RA			1.2	1.4.3.1	D-aspartate oxidase
ACYPI004243-RA		2.37	2.91	2.6.1.1	aspartate transaminase
ACYPI009960-RA		2.96	-2.19	4.1.1.15	glutamate decarboxylase
ACYPI009687-RA		-1.16		6.1.1.19	arginine-tRNA ligase

***3-Phosphoglycerate biosynthetic family***

(serine, cysteine, glycine)

Gene ID	EE-IE	IE-LE	LE-L1	EC	BRENDA enzyme name
ACYPI002000-RA	1.04	1.32		1.1.1.29	glycerate dehydrogenase
ACYPI008912-RA			1.2	1.4.3.1	D-aspartate oxidase
ACYPI006227-RA		1.72		2.6.1.44	alanine-glyoxylate transaminase
ACYPI004296-RA		-1.73	1.51	2.6.1.44	alanine-glyoxylate transaminase
ACYPI005679-RA		2.02		2.6.1.44	alanine-glyoxylate transaminase
ACYPI007966-RA			1.16	2.7.1.31	glycerate kinase
ACYPI000304-RA			-1.01	3.1.3.3	phosphoserine phosphatase
ACYPI000540-RA		1.09		4.1.2.5	threonine aldolase
ACYPI000593-RA			1.18	4.4.1.1	cystathionine gamma-lyase

**B) Liste des gènes différentiels appartenant aux familles de dégradation des acides aminés.**

Les gènes sont classés en fonctions des produits terminaux engendrés par la dégradation des acides aminés.

***α-ketoglutarate degradation family***

(arginine, glutamine, glutamate, histidine, proline)

Gene ID	EE-IE	IE-LE	LE-L1	EC	BRENDA enzyme name
ACYPI004243-RA		2.37	2.91	2.6.1.1	aspartate transaminase
ACYPI003246-RA			-2.01	2.6.1.16	glutamine-fructose-6-phosphate transaminase (isomerizing)
ACYPI009960-RA		2.96	-2.19	4.1.1.15	glutamate decarboxylase

***Succinyl-CoA degradation family***

(isoleucine, methionine, threonine, valine)

Gene ID	EE-IE	IE-LE	LE-L1	EC	BRENDA enzyme name
ACYPI005866-RA	1.52			1.2.1.3	aldehyde dehydrogenase (NAD+)
ACYPI008095-RA			1.05	4.2.1.17	enoyl-CoA hydratase

***Oxaloacetate degradation family***

(aspartic acid, asparagine)

Gene ID	EE-IE	IE-LE	LE-L1	EC	BRENDA enzyme name
ACYPI008912-RA			1.2	1.4.3.1	D-aspartate oxidase
ACYPI006025-RA			1.01	2.3.1.12	dihydrolipoyllysine-residue acetyltransferase
ACYPI004243-RA		2.37	2.91	2.6.1.1	aspartate transaminase
ACYPI006227-RA		1.72		2.6.1.44	alanine-glyoxylate transaminase
ACYPI004296-RA	-1.73		1.51	2.6.1.44	alanine-glyoxylate transaminase
ACYPI005679-RA		2.02		2.6.1.44	alanine-glyoxylate transaminase
ACYPI000168-RA			1.3	3.5.1.1	asparaginase
ACYPI006616-RA		1.11		6.3.4.4	adenylosuccinate synthase

***Pyruvate degradation family***

(alanine, cysteine, glycine, serine)

Gene ID	EE-IE	IE-LE	LE-L1	EC	BRENDA enzyme name
ACYPI006025-RA			1.01	2.3.1.12	dihydrolipoyllysine-residue acetyltransferase

***Acetyl-CoA and acetoacetyl-CoA degradation family***

(isoleucine, leucine, lysine, phenylalanine, tryptophan, tyrosine)

Gene ID	EE-IE	IE-LE	LE-L1	EC	BRENDA enzyme name
ACYPI007395-RA			-1.38	1.14.13.9	kynurenine 3-monooxygenase
ACYPI009436-RA			1.21	1.3.99.10	isovaleryl-CoA dehydrogenase
ACYPI002843-RA		1.89		2.3.1.9	acetyl-CoA C-acetyltransferase
ACYPI006116-RA			1.27	2.3.3.10	hydroxymethylglutaryl-CoA synthase
ACYPI004243-RA		2.37	2.91	2.6.1.1	aspartate transaminase
ACYPI008095-RA			1.05	4.2.1.17	enoyl-CoA hydratase

**Tableau S3. Liste des gènes codant des transporteurs d'acides aminés ou de sodium, potassium et chlore chez le puceron de pois (d'après Price *et al.*, 2011), différentiellement exprimés au cours du développement.**

Pour chaque gène, sont indiquées : la ou les comparaison(s) dans la ou laquelle(s) les gènes ont montré une variation significative d'expression et la différence d'expression observée correspondante (différence des expression exprimées en log2). Sont représentées : en rouge, les augmentations significatives d'expression et en bleu, les diminutions significatives d'expression au cours du développement.

#	Gène	Classe	Comparaison	Différence d'expression
1	ACYPI000153-RA	AAAP	IE-LE LE-L1	-3,53 -1,54
2	ACYPI000333-RA	AAAP	LE-L1	-1,40
3	ACYPI004320-RA	AAAP	EE-IE IE-LE	1,53 2,04
4	ACYPI006258-RA	AAAP	LE-L1	-3,47
5	ACYPI008849-RA	AAAP	EE-IE	1,21
6	ACYPI008957-RA	AAAP	IE-LE LE-L1	-1,61 -3,68
7	ACYPI000537-RA	APC	EE-IE IE-LE	1,84 3,16
8	ACYPI000584-RA	APC	EE-IE IE-LE	1,23 1,36
9	ACYPI002633-RA	APC	EE-IE IE-LE	1,46 1,28
10	ACYPI003240-RA	APC	EE-IE IE-LE	3,41 3,85
11	ACYPI003523-RA	APC	EE-IE IE-LE	2,41 4,50
12	ACYPI003923-RA	APC	LE-L1	1,18
13	ACYPI005156-RA	APC	EE-IE IE-LE	1,94 2,60
14	ACYPI005472-RA	APC	EE-IE	1,85
15	ACYPI005720-RA	APC	EE-IE	1,37
16	ACYPI006356-RA	APC	EE-IE	1,88
17	ACYPI009467-RA	APC	LE-L1	-1,25
18	ACYPI000370-RA	Na-K-Cl	IE-LE	-1,36
19	ACYPI007138-RA	Na-K-Cl	EE-IE LE-L1	1,40 -1,27
20	ACYPI007154-RA	Na-K-Cl	EE-IE IE-LE LE-L1	1,56 1,51 -1,61

**Tableau S4. Liste des gènes liés aux constituants structuraux de la cuticule (classe GO:0042302) chez le puceron de pois et leur variation d'expression au cours du développement.**

Pour chaque gène, sont indiquées : la ou les comparaison(s) dans la ou laquelle(s) les gènes ont montré une variation significative d'expression et la différence d'expression observée correspondante (différence des expression exprimées en log2). Sont représentées : en rouge, les augmentations significatives d'expression ; en bleu, les diminutions significatives d'expression au cours du développement. Les gènes ne variant pas significativement d'expression dans nos comparaisons sont indiqués par « NA ».

#	Gène	Comparaison	Différence d'expression
1	ACYPI000291-RA	IE-LE LE-L1	3.92 -2.36
2	ACYPI000300-RA	IE-LE LE-L1	2.21 -2.88
3	ACYPI000372-RA	IE-LE LE-L1	5.21 -5.34
4	ACYPI000670-RA	EE-IE LE-L1	1.79 -2.2
5	ACYPI000889-RA	EE-IE IE-LE	4.1 3.5
6	ACYPI000943-RA	IE-LE LE-L1	2.2 -4.66
7	ACYPI000961-RA	IE-LE LE-L1	1.65 -3.49
8	ACYPI000983-RA	IE-LE LE-L1	4.17 -4.04
9	ACYPI001084-RA	IE-LE LE-L1	4.05 -4.2
10	ACYPI001095-RA	EE-IE IE-LE	1.36 6.33
11	ACYPI001564-RA	IE-LE	3.78
12	ACYPI001599-RA	EE-IE IE-LE	2.44 2.77
13	ACYPI001610-RA	EE-IE IE-LE LE-L1	1.91 4.11 -1.97
14	ACYPI001644-RA	IE-LE	3.79
15	ACYPI001775-RA	EE-IE IE-LE	4.56 2.96
16	ACYPI001908-RA	LE-L1	-2.87
17	ACYPI002200-RA	IE-LE LE-L1	4.06 -4.29
18	ACYPI002234-RA	IE-LE	4.71
19	ACYPI002243-RA	IE-LE	5.17
20	ACYPI002889-RA	IE-LE LE-L1	4.86 -5.15
21	ACYPI002964-RA	IE-LE	2.28
22	ACYPI003003-RA	IE-LE LE-L1	4.19 -4.86
23	ACYPI003073-RA	IE-LE LE-L1	2.93 -4.73

24	ACYPI003229-RA	IE-LE LE-L1	4.56 -4.95
25	ACYPI003453-RA	IE-LE	5.07
26	ACYPI003527-RA	IE-LE	3.76
26	ACYPI003649-RA	IE-LE	2.83
28	ACYPI003698-RA	IE-LE LE-L1	4.7 -5.53
29	ACYPI004074-RA	IE-LE	4.73
30	ACYPI004893-RA	IE-LE LE-L1	3.33 -3.04
31	ACYPI004943-RA	EE-IE IE-LE	2.42 4.35
32	ACYPI005071-RA	NA	NA
33	ACYPI005387-RA	IE-LE	5.53
34	ACYPI005443-RA	NA	NA
35	ACYPI005591-RA	IE-LE	-4.7
36	ACYPI005967-RA	NA	NA
37	ACYPI006015-RA	IE-LE LE-L1	3.73 -2.63
38	ACYPI006045-RA	IE-LE	2.71
39	ACYPI006046-RA	IE-LE	7.44
	ACYPI006046-RA	LE-L1	-4.33
40	ACYPI006099-RA	NA	NA
	ACYPI006250-RA	IE-LE	6.95
41	ACYPI006250-RB	EE-IE IE-LE	1.09 5.36
42	ACYPI006276-RA	IE-LE LE-L1	2.6 -3.05
43	ACYPI006670-RA	IE-LE	2.23
44	ACYPI006712-RA	IE-LE LE-L1	2.72 -3.95
45	ACYPI006791-RA	IE-LE	4.28
46	ACYPI007329-RA	IE-LE LE-L1	6.35 -7.65
47	ACYPI007888-RA	IE-LE	4.69
48	ACYPI007927-RA	IE-LE LE-L1	3.59 -4.72
49	ACYPI007928-RA	IE-LE LE-L1	4.56 -4.03
50	ACYPI008113-RA	LE-L1	-1.36
51	ACYPI008156-RA	NA	NA
52	ACYPI008524-RA	IE-LE LE-L1	7.36 -2.41
53	ACYPI008534-RA	IE-LE LE-L1	5.71 -1.95
54	ACYPI008570-RA	IE-LE	4.81
55	ACYPI009006-RA	IE-LE	2.05
		EE-IE	2.75
56	ACYPI009152-RA	IE-LE LE-L1	2.66 -3.65
57	ACYPI009260-RA	IE-LE LE-L1	7.82 -7.09



58	ACYPI009763-RA	IE-LE LE-L1	3.59 -2.03
59	ACYPI009803-RA	IE-LE LE-L1	3.89 -3.5
60	ACYPI009804-RA	IE-LE	5.49
61	ACYPI009812-RA	NA	NA
62	ACYPI010234-RA	EE-IE	2.82
63	ACYPI23843-RA	NA	NA
64	ACYPI26371-RA	NA	NA
65	ACYPI29043-RA	NA	NA
66	ACYPI32811-RA	IE-LE LE-L1	3.03 -2.98
67	ACYPI32812-RA	LE-L1	-3.04
68	ACYPI35873-RA	IE-LE LE-L1	3.07 -3.84
69	ACYPI35881-RA	IE-LE LE-L1	1.86 -2.11
70	ACYPI38155-RA	NA	NA
71	ACYPI42531-RA	IE-LE LE-L1	3.16 -4.25
72	ACYPI52218-RA	EE-IE LE-L1	1.9 1.58
73	ACYPI54769-RA	LE-L1	-1.46
74	ACYPI56307-RA	LE-L1	-1.61



FOLIO ADMINISTRATIF

THESE SOUTENUE DEVANT L'INSTITUT NATIONAL DES SCIENCES APPLIQUEES DE LYON

NOM : RABATEL	DATE de SOUTENANCE : 12/12/2011
Prénoms : Andréane	
TITRE : Développement embryonnaire du puceron <i>Acyrtosiphon pisum</i> : caractérisation de voies métaboliques et gènes clé dans les interactions trophiques avec <i>Buchnera aphidicola</i>	
NATURE : Doctorat	Numéro d'ordre : 2011-ISAL-0137
Ecole doctorale : Évolution, Écosystèmes, Microbiologie, Modélisation (E2M2)	
Spécialité : Micro-organismes, interactions, infections	
RESUME :	
<p>Les pucerons sont parmi les principaux ravageurs des cultures dans les régions tempérées. Leur succès comme parasites de plantes repose sur leur fort potentiel reproductif dû à la parthénogénèse durant le printemps et l'été ainsi qu'à la symbiose avec <i>Buchnera aphidicola</i>. Cette bactérie symbiotique obligatoire fournit aux pucerons les acides aminés essentiels qui sont déficients dans leur alimentation déséquilibrée (constituée essentiellement de la sève élaborée des plantes), et contribue ainsi à leur développement et reproduction. Le premier volet de ce travail de thèse a consisté à déterminer les besoins en acides aminés des différents stades du développement embryonnaire et larvaire, afin d'identifier des facteurs clé de l'association symbiotique au cours du développement du puceron du pois. L'étude de la teneur et de la composition en acides aminés protéiques et libres met en évidence des exigences métaboliques évoluant entre les différents stades de développement du puceron. Afin de différencier l'implication de chaque compartiment (maternel, embryonnaire) dans la nutrition des embryons, ces derniers ont été mis en culture dans des milieux ayant des compositions différentes en acides aminés. Les plus faibles croissance et synthèse protéique observées chez les embryons qui se développent sur milieux carencés, montrent leur dépendance au compartiment maternel pour leur approvisionnement en acides aminés. L'ensemble de ces études révèle que de forts besoins en acides aminés aromatiques, notamment en tyrosine, caractérisent les stades embryonnaires tardifs et le premier stade larvaire précoce chez le puceron du pois. Le deuxième volet de cette thèse a alors eu pour objectif l'identification de gènes cibles à l'intérieur des voies révélées par l'approche métabolique. A l'aide d'une puce à ADN, contenant 24 011 transcrits codés par le génome du puceron du pois, les profils d'expression des gènes du puceron ont été analysés au cours du développement de l'insecte. L'analyse fonctionnelle des différents groupes de gènes ainsi repérés montre que les gènes liés au métabolisme des acides aminés présentent de hauts niveaux d'expression mais également des variations significatives dans les passages entre les différents stades. La voie métabolique des acides aminés aromatiques et tout particulièrement les gènes menant à la synthèse de la tyrosine sont parmi les plus sollicités chez les embryons tardifs. Notre analyse montre également une forte sollicitation des gènes/voies liés à la formation et à la maturation de la cuticule dans les stades embryonnaires précédents la ponte. L'ensemble des résultats obtenus par les approches métabolique et transcriptomique suggère ainsi une synthèse et une accumulation de tyrosine au cours du développement embryonnaire, en vue de son utilisation comme précurseur pour la sclérotisation et le tannage cuticulaire après la ponte. Par conséquent, le dernier volet de ce travail de thèse a consisté en une analyse fonctionnelle du rôle du gène ACYPI007803, codant l'enzyme catalysant la synthèse de la tyrosine à partir de la phénylalanine, par la technique d'ARN interférence (RNAi). Une augmentation de la mortalité des larves pondues par les femelles traitées est corrélée à la diminution de l'expression du gène cible dans les compartiments symbiotiques (les chaînes embryonnaires et les bactériocytes maternels) et confirme ainsi le rôle clé du gène ACYPI007803 dans le développement des embryons chez le puceron du pois.</p>	
MOTS-CLES : <i>Acyrtosiphon pisum</i> , <i>Buchnera aphidicola</i> , développement embryonnaire, acides aminés aromatiques, tyrosine, cuticule, analyse transcriptomique, RNAi	
Laboratoire de recherche : UMR 0203 INRA / INSA de Lyon BF2I (Biologie Fonctionnelle Insectes et Interactions)	
Directeurs de thèse: Federica Calevro, Gérard Febvay	
Composition du jury :	Président : N. Volkoff Rapporteurs : V. Brault, E. Huguet Examineurs : S. Colella, N. Mondy Directeurs : F. Calevro, G. Febvay