



HAL
open science

Caractérisation de l'expression de gènes impliqués dans le métabolisme symbiotique chez le puceron du pois *Acyrtosiphon pisum*

François Cochet

► **To cite this version:**

François Cochet. Caractérisation de l'expression de gènes impliqués dans le métabolisme symbiotique chez le puceron du pois *Acyrtosiphon pisum*. [Stage] Institut Universitaire de Technologie de Lyon (IUT Lyon), FRA. 2009, 30 p. hal-02811739

HAL Id: hal-02811739

<https://hal.inrae.fr/hal-02811739v1>

Submitted on 6 Jun 2020

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.

UMR 203 BF2I, INRA - INSA de Lyon



Caractérisation de l'expression de gènes impliqués dans le métabolisme symbiotique chez le puceron du pois

Optimisation des protocoles d'extraction d'ARN et de RT-PCR (classique et en temps réel) à partir de 5 compartiments de puceron

Encadrants : F. Calevro – S. Colella

François Cochet

Entomotoxines
peptidiques et
cibles cellulaires



Biodiversité et
nutrition des
auxiliaires de
lutte biologique



Symbiose :
signalisations
moléculaires et
immunitaires



Symbiose :
génomique
fonctionnelle des
interactions
trophiques

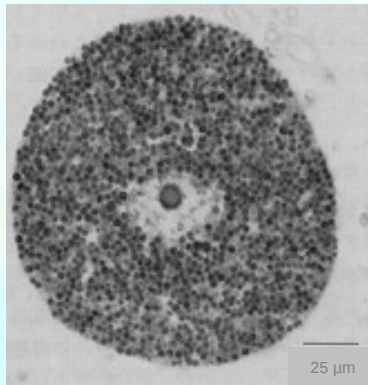
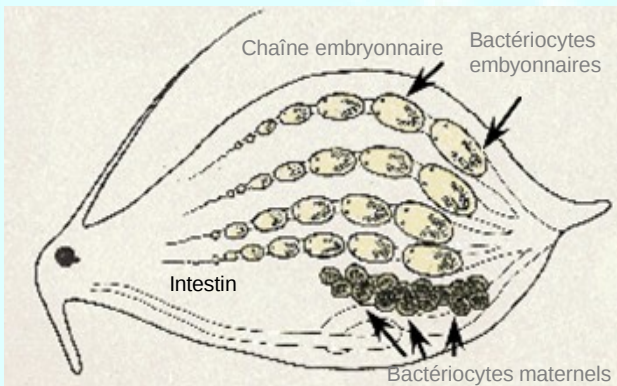


Acyrtosiphon pisum et *Buchnera*

Les bases trophiques de l'association symbiotique : échanges d'acides aminés entre les 2 partenaires



- **Importants ravageurs** et impact économique majeur en régions tempérées.
- Source nutritive : **sève phloémienne** des plantes **déséquilibrée en acides aminés**.
- *Buchnera* : Endosymbiote **fournissant au puceron les acides aminés absents** dans la sève des plantes (acides aminés essentiels).



L'UMR BF2I s'intéresse à l'étude des réseaux de régulation à la base de l'association symbiotique entre *Acyrtosiphon pisum* et la bactérie *Buchnera*.

Identification de cibles spécifiques à la symbiose pour développer des nouvelles stratégies de lutte contre les pucerons.



Introduction	Objectifs	Protocole expérimental	Résultats	Conclusions
--------------	-----------	------------------------	-----------	-------------



Modèle : *A.pisum*

Introduction

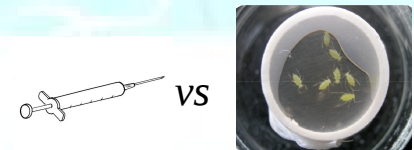
But du projet *Aphicibles* (BF2I):

- ❖ Identification des gènes cibles de la symbiose entre les pucerons et *Buchnera* : applications en lutte intégrée à long terme ?

⇒ Caractérisation fonctionnelle des cibles potentielles par une approche d'interférence par l'ARN (RNAi)

RNAi chez le puceron :

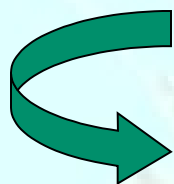
- ❖ Seulement quelques travaux (4)
- ❖ 2 stratégies : injection et milieu artificiel
- ❖ A réaliser au plus tôt dans le développement larvaire



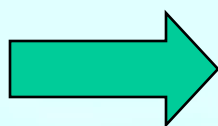
Introduction	Objectifs	Protocole expérimental	Résultats	Conclusions
--------------	-----------	------------------------	-----------	-------------

Objectifs

- Mise au point des protocoles visant à quantifier l'**expression d'un gène** à partir de **quantités très faibles** d'ARN



Étude de l'expression de 11 gènes dans 5 compartiments d'un individu adulte.



Détection à l'échelle de 5 parties du puceron le degré d'inactivation fonctionnelle après RNAi

Introduction	Objectifs	Protocole expérimental	Résultats	Conclusions
--------------	-----------	------------------------	-----------	-------------

Plan de travail

- ✓ Recherche des amorces et validation des conditions de PCR
- ✓ Dissection du puceron et extraction des ARN
- ✓ RT à partir de faibles quantités d'ARN
- ✓ Analyse du profil d'expression des gènes testés par RT-PCR
- ✓ Validation des conditions de RT-PCR quantitative

Introduction	Objectifs	Protocole expérimental	Résultats	Conclusions
--------------	-----------	------------------------	-----------	-------------

Gènes sélectionnés

	gène	référence
travaux RNAi antérieurs	<i>Cathepsine</i>	Jaubert <i>et al.</i> (microinjection)
	<i>Calréticuline</i>	
	<i>Aquaporine-4</i>	Shakesby <i>et al.</i> (ingestion)
importance métabolique	<i>GS2</i>	-
	<i>Henna</i>	-
	<i>Cysthationine γ-lyase</i>	-
	<i>MC</i>	-
potentiellement létaux	<i>AGAP</i>	-
	<i>VacATPase</i>	Baum <i>et al.</i> (trangenèse)
	<i>ANT2</i>	-
normalisation en qPCR	<i>GAPDH</i>	-

Introduction	Objectifs	Protocole expérimental	Résultats	Conclusions
--------------	-----------	------------------------	-----------	-------------

Définition des amorces

- => Logiciel *oligo* 6.8



<http://www.oligo.net>

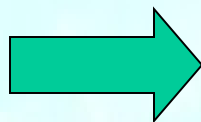
+ Recherche des conditions de fonctionnement optimales des amorces sur ADNg.

Introduction	Objectifs	Protocole expérimental	Résultats	Conclusions
--------------	-----------	------------------------	-----------	-------------

Dissection, extractions des ARN



A. pisum adulte
longueur : 3mm



Extractions
séparées
des ARN

- Tête
- Embryons (contiennent *Buchnera*)
- Tube digestif
- Bactériocytes (contiennent *Buchnera*)
- Carcasse

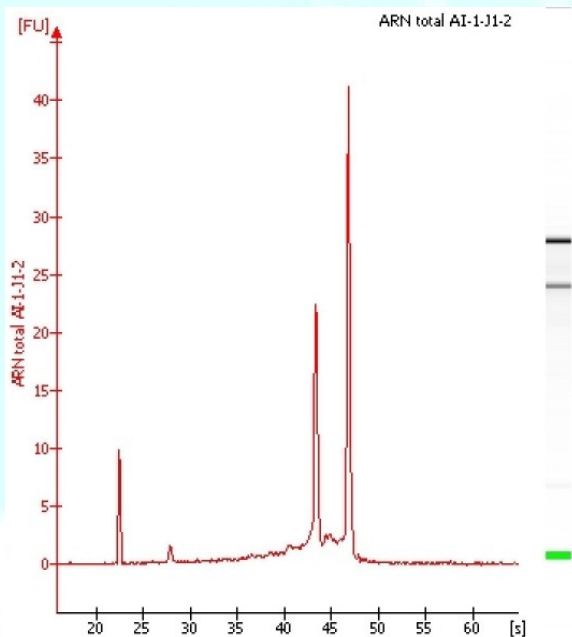
Analyse quantité/qualité des ARN



Spectrophotomètre
(*Nanodrop*)



Quantité d'ARN

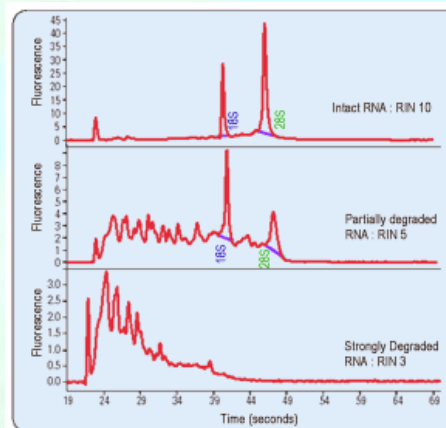


Électrophorèse capillaire (*Agilent Bioanalyzer*)

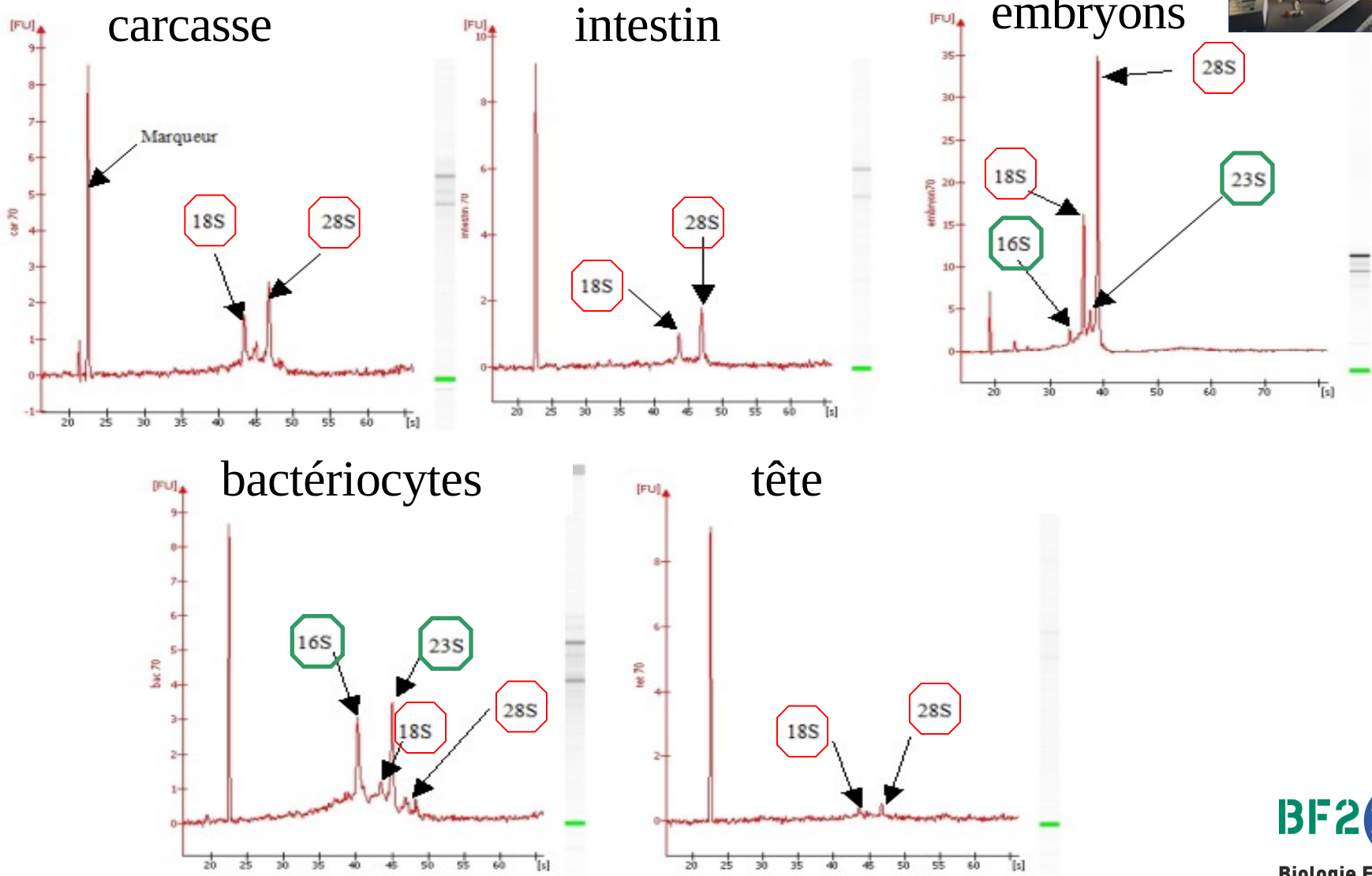


Qualité d'ARN

Qualité décroissante
des ARN ...



Résultats du bioanalyseur

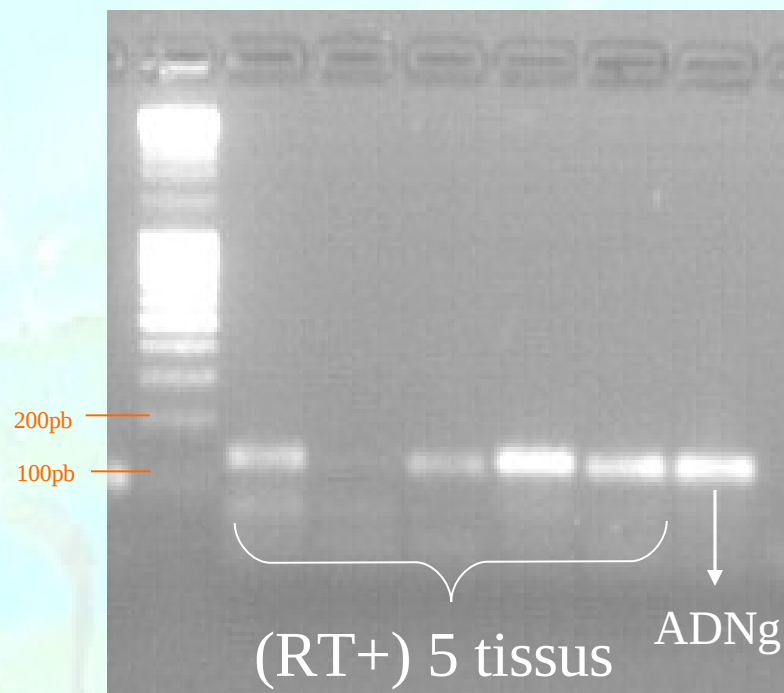
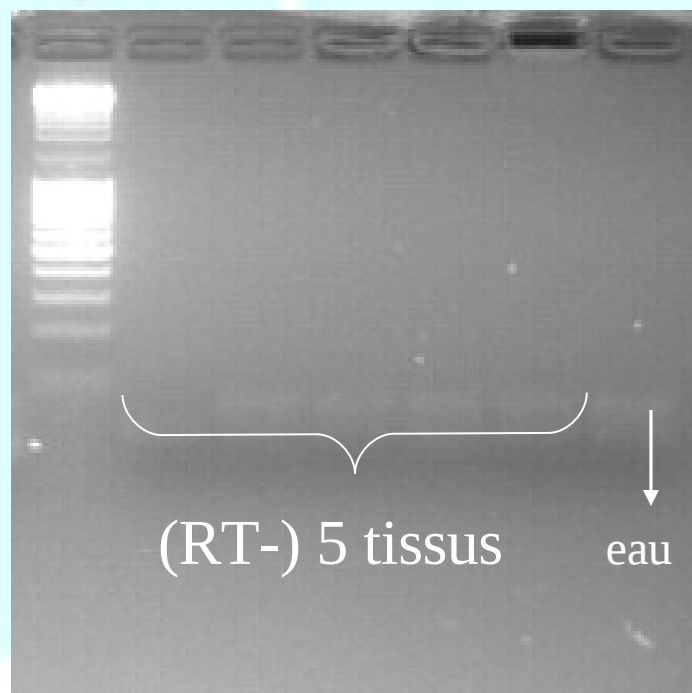


Introduction	Objectifs	Protocole expérimental	Résultats	Conclusions
--------------	-----------	------------------------	-----------	-------------

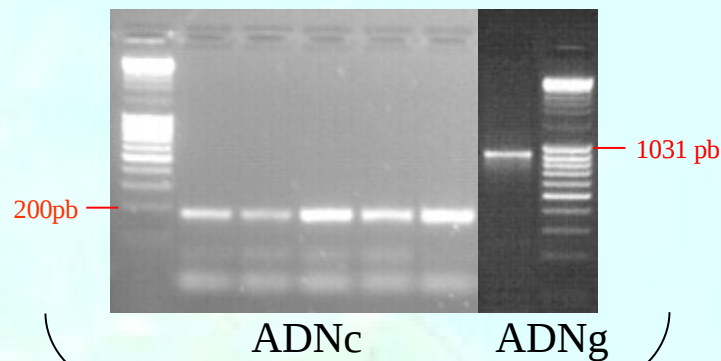
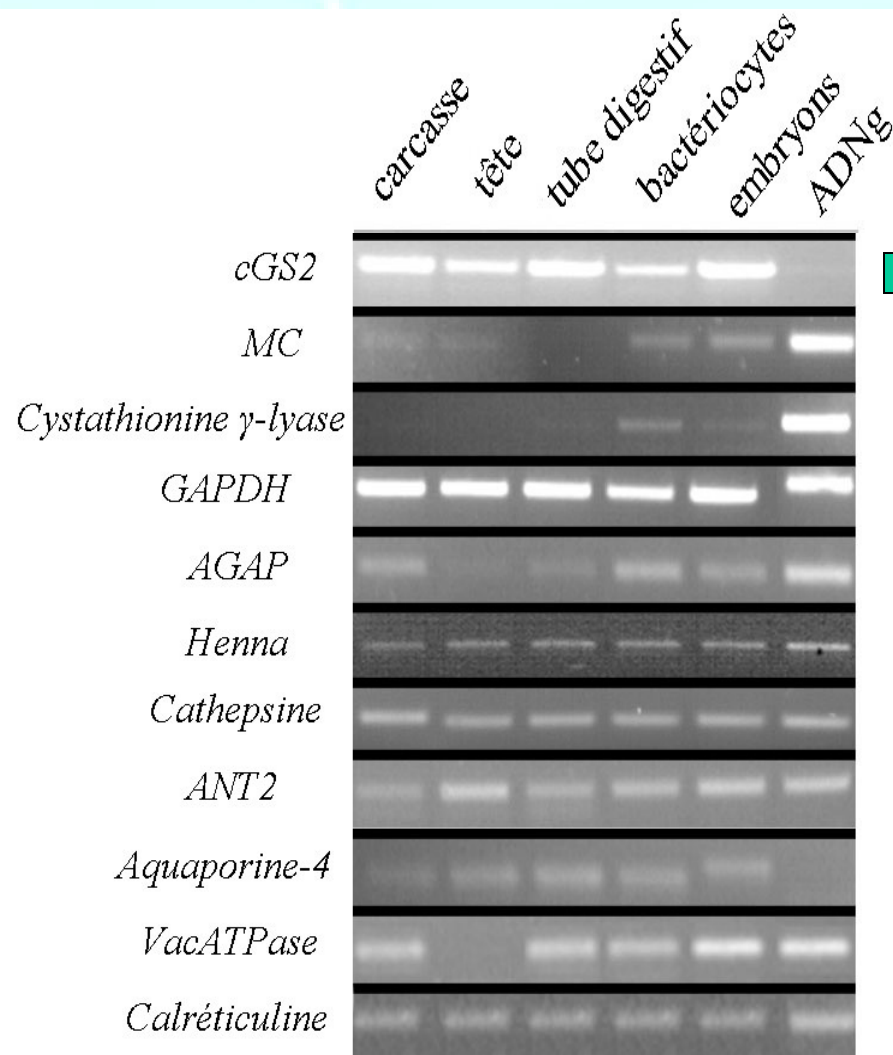
Résultats de RT-PCR

10ng par RT avec le kit *Sensiscript* (QIAGEN)

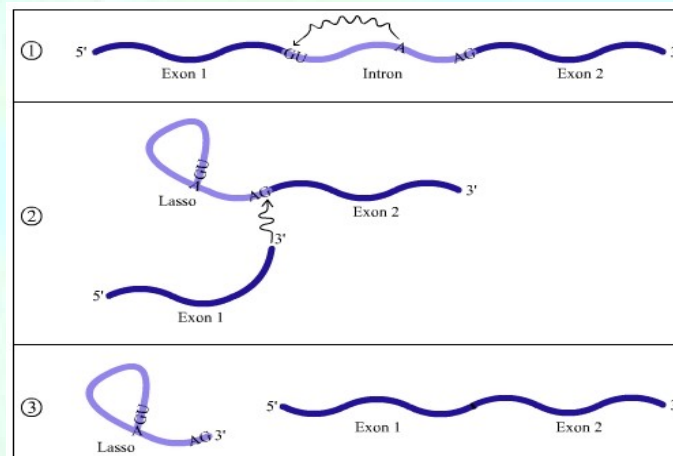
Exemple de gel avec le gène VacATPase ...



Résumé des résultats de RT-PCR

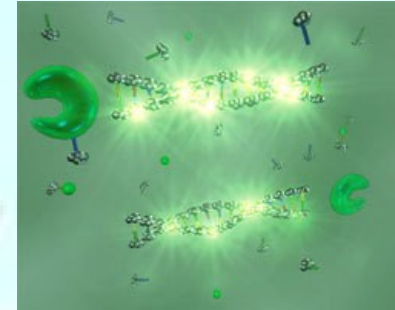


Séquençage

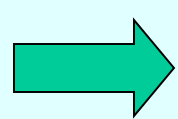


qRT-PCR

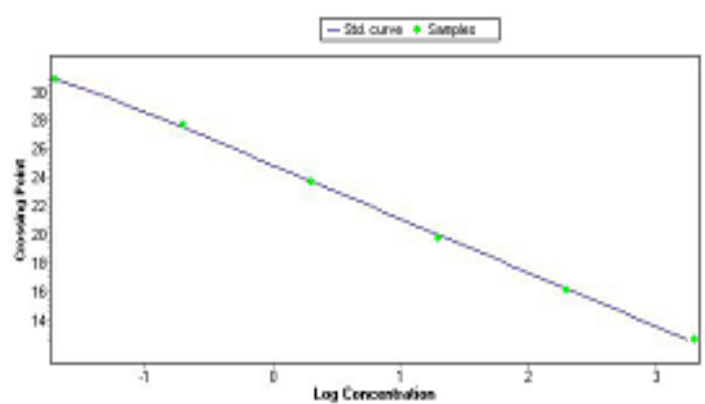
- Construction de la courbe étalon (6 dilutions de produits PCR purifiés)
- Mesures sur les échantillons par comparaison aux signaux obtenus avec les dilutions



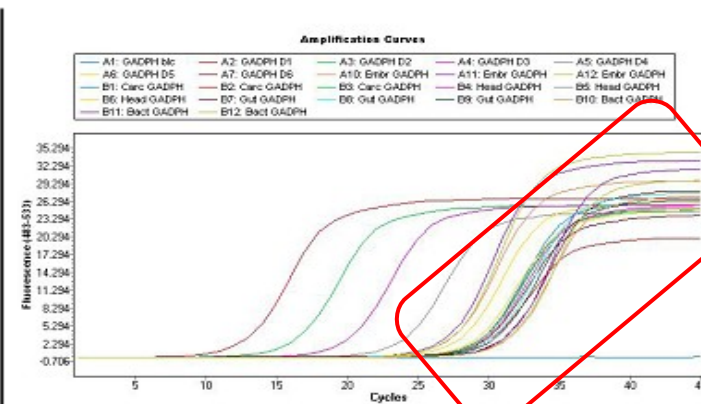
SYBR Green I



Tester pour *Aquaporine-4*, *ANT2* et *GAPDH* les conditions de PCR en temps réel



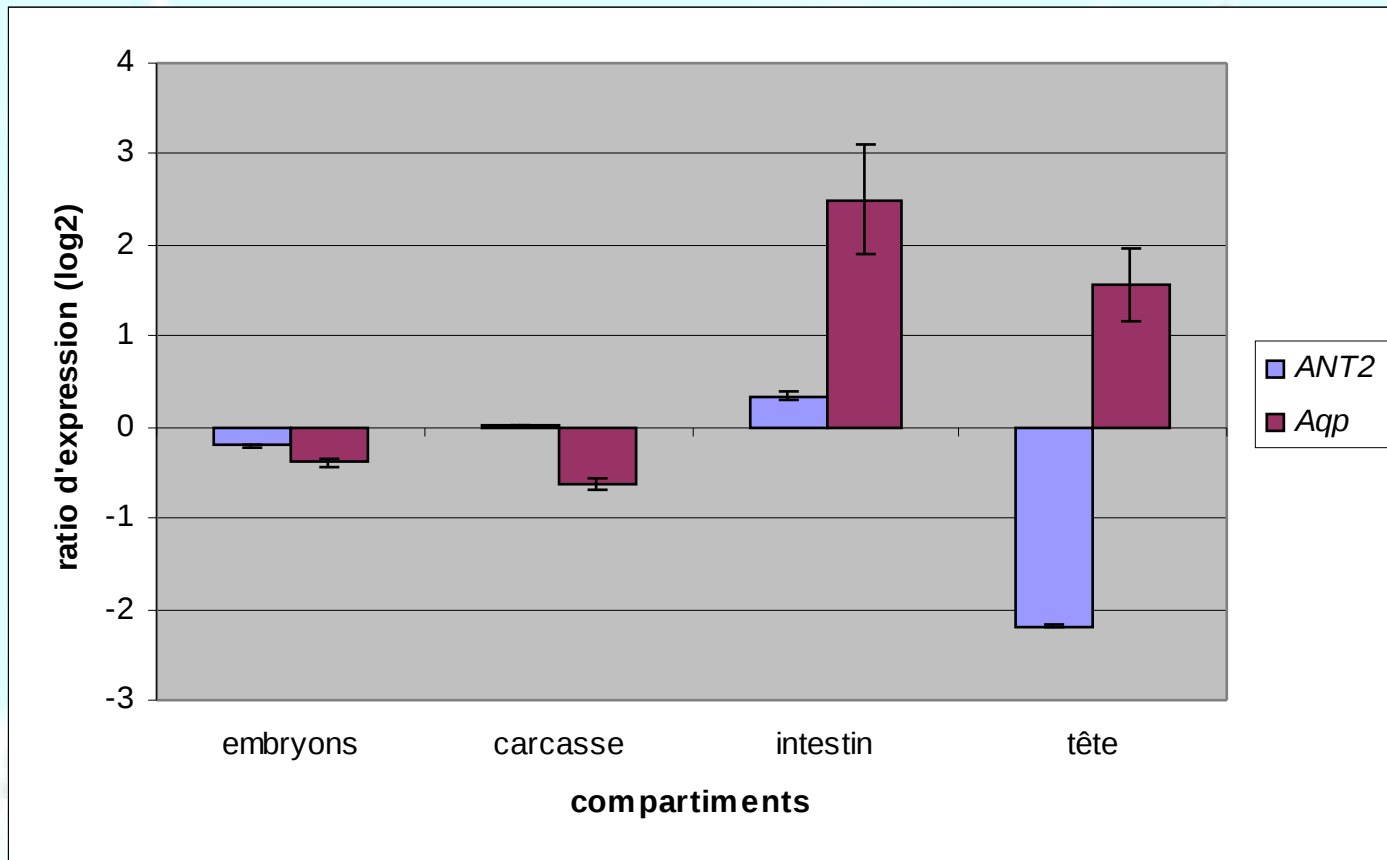
GAPDH



GAPDH

qRT-PCR

Analyse *REST* des données (*Relative Expression Software Tool*)



Expression relative, comparativement au gène de normalisation GAPDH, des gènes *ANT2* et *Aquaporine-4* dans les tissus du puceron.

Introduction	Objectifs	Protocole expérimental	Résultats	Conclusions
--------------	-----------	------------------------	-----------	-------------

Conclusions

- Mise au point des conditions pour analyser par RT-PCR les 11 gènes sélectionnés à partir de faibles quantités d'ARN
- Test des conditions de PCR quantitative (en temps réel) pour 3 gènes

 **Caractérisation de l'expression des 11 gènes dans 5 compartiments chez le puceron du pois et projet RNAi**

Bilan personnel

- Meilleure compréhension du rôle de la biologie moléculaire
- Découverte de la PCR en temps réel
- Travail à la base d'une longue étude en cours
- Connaissance du mode de fonctionnement d'un laboratoire de recherche

Remerciements

Yvan Rahbé
Gérard Febvay

Federica Calevro
Stefano Colella

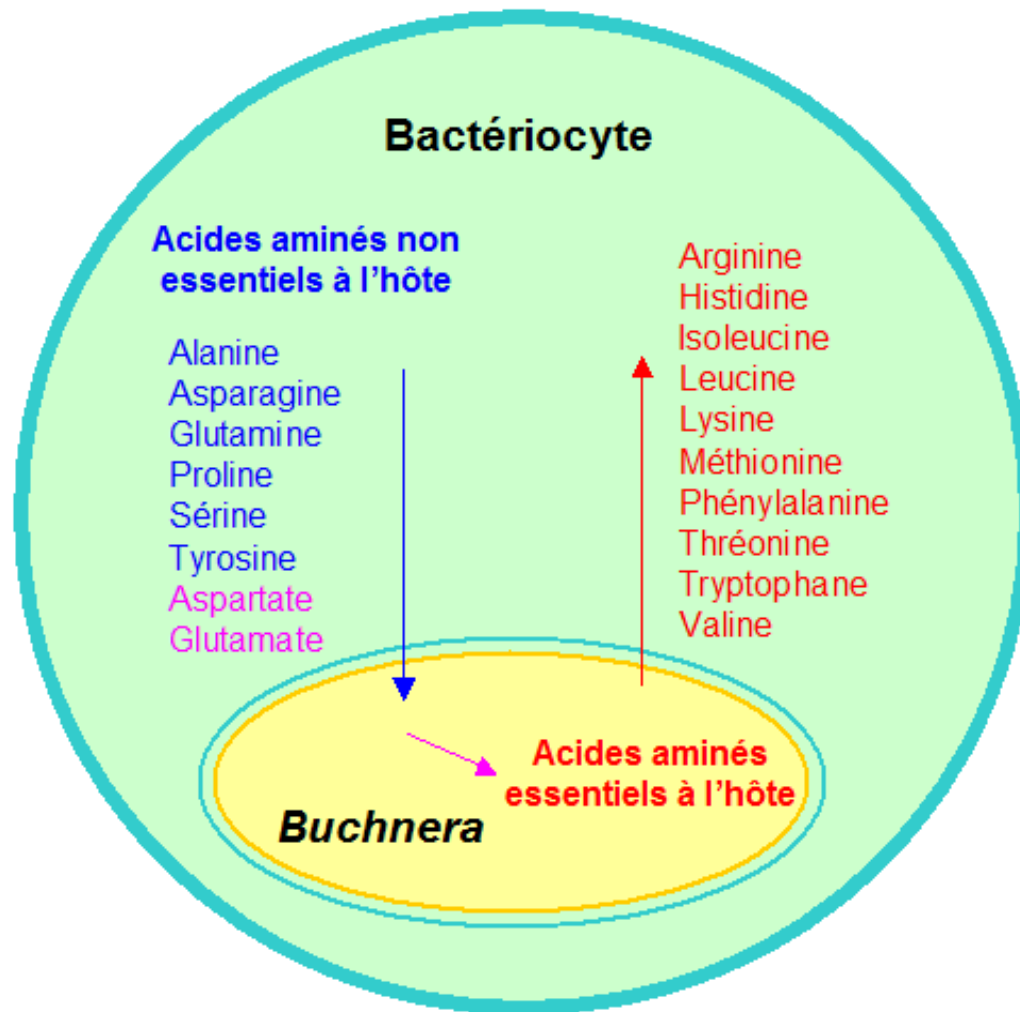
Hubert Charles
J.Michel Fayard

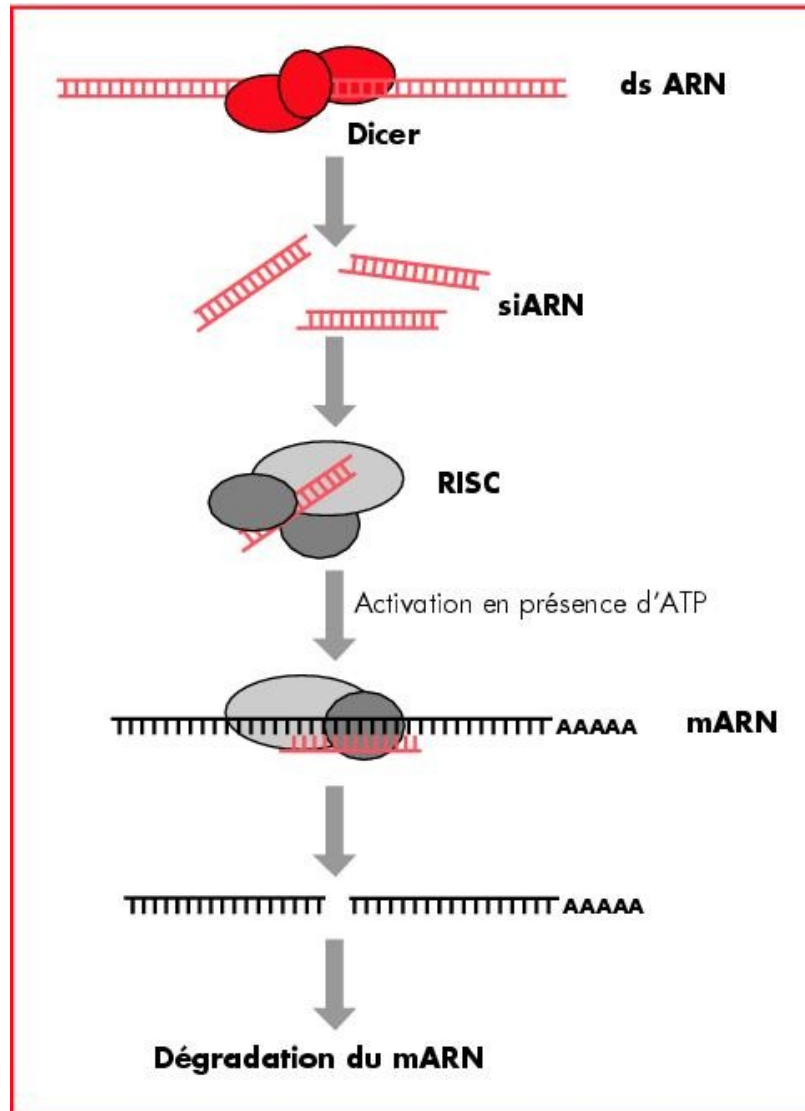
L'équipe *Symtrophique*

Panos Sapountzis
Augusto Vellozo
Nadia Bendridi

Gabrielle Duport
Karen Gaget
Marjolaine Rey

Andréane Rabatel
Lilia Brinza
Abdullah Ahmed





1

Le SybrGreen libre émet peu de fluorescence

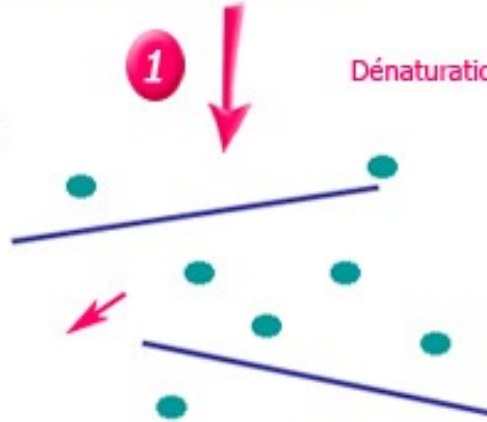
Amorce
5' → 3'

SybrGreen™ libre



1

Dénaturation

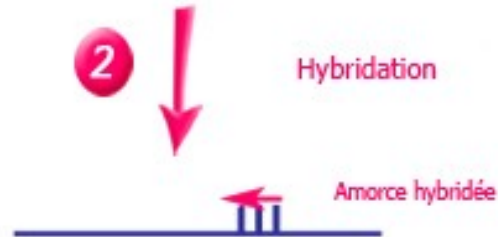


2

L'amorce s'hybride sur sa séquence cible

2

Hybridation



3

Accroissement de la fluorescence proportionnel à l'intégration du SybrGreen

3

Elongation 55°C

SybrGreen™ incorporé activé



Mesure de la fluorescence

