



Rapport de stage de deuxième année



Laboratoire BF2I



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



Année 2008-2009
Période de stage : 30 mars - 3 juillet 09
Encadrants : Federica CALEVRO - Stefano COLELLA
Tél : 04 72 43 83 56

UMR 203 INRA-INSA Lyon
Bâtiment Louis Pasteur
11 avenue Jean Capelle
69621 VILLEURBANNE

Remerciements

Je tiens tout d'abord à remercier Yvan Rahbé (directeur de l'UMR) et Hubert Charles (animateur d'équipe), pour m'avoir accueilli avec enthousiasme au sein de l'équipe « Symtrophique » du laboratoire.

Merci à Federica Calevro (enseignante chercheuse et maître de stage), pour toutes les explications qu'elle a pu me fournir qui ont toujours été accompagnées de sa gentillesse indiscutable. Son aide précieuse pour la rédaction du rapport de stage a également été très appréciable.

J'adresse également ma reconnaissance envers Stefano Colella (chercheur et encadrant), qui m'a permis de partager son bureau dans une atmosphère joyeuse. J'ai également apprécié son souci de connaître l'avancée du travail pratique et de mon rapport de stage, ainsi que son aide lors de la rédaction de celui-ci.

Je voudrais également exprimer mes remerciements à Panagiotis Sapountzis (post-doc), avec qui j'ai travaillé pendant ces 14 semaines de stage dans une très bonne ambiance.

Merci aussi à Gabrielle Duport (technicienne historique de l'équipe), Karen Gaget (assistante ingénieur) et Andréane Rabatel (doctorante) pour leur collaboration appréciable et leur amabilité durant les différentes étapes du projet.

Je remercie de même Alain Clavel pour la fourniture des plants de fèves, support sans lesquels il serait impossible de travailler sur les pucerons.

Enfin, merci à tout le personnel du laboratoire pour son accueil chaleureux tout au long de cette période de stage de fin d'année.

Sommaire

1.	<u>Présentation de la structure d'accueil</u>	1
2.	<u>Introduction</u>	
	2.1 A propos des pucerons.....	3
	2.2 A propos de <i>Buchnera</i>	5
	2.3 L'approche RNAi chez le puceron.....	6
3.	<u>Objectifs du stage</u>	8
4.	<u>Matériel et méthodes</u>	
	4.1 L'élevage d' <i>Acyrtosiphon pisum</i> à BF2I.....	9
	4.2 Sélection de gènes impliqués dans la symbiose puceron/ <i>Buchnera</i>	9
	4.3 Définition des amorces.....	11
	4.4 Dissection du puceron.....	12
	4.5 Extraction des ARN à partir des 5 compartiments tissulaires du puceron.....	12
	4.6 Dosage au <i>Nanodrop</i>	12
	4.7 Vérification de l'intégrité des ARN.....	13
	4.8 RT-PCR.....	14
	4.9 qRT-PCR.....	17
5.	<u>Résultats et discussion</u>	
	5.1 Dosage des ARN extraits.....	20
	5.2 Vérification de l'intégrité des ARN.....	20
	5.3 RT-PCR.....	21
	5.4 qRT-PCR.....	23
6.	<u>Conclusions, perspectives et bilan personnel</u>	25
7.	<u>Références bibliographiques</u>	26

1. Présentation de la structure d'accueil

Le laboratoire BF2I (Biologie Fonctionnelle, Insectes et Interactions) est situé sur le campus de La Doua à Villeurbanne (Rhône). Il est organisé sous forme d'UMR (Unité Mixte de Recherche) et se trouve sous la tutelle de deux organismes : l'Institut National des Sciences Appliquées (INSA) de Lyon et de l'Institut National de la Recherche Agronomique (INRA).

L'INSA de Lyon est une école d'ingénieurs comprenant un centre actif de recherches scientifiques et de formation couvrant la plupart des disciplines de l'ingénieur. Les écoles INSA de France comptent parmi les plus grandes écoles d'ingénieurs de France. Associés aux différents départements de formation de l'INSA de Lyon, il existe 27 laboratoires de recherche qui rassemblent plus de 1000 chercheurs, enseignants-chercheurs et techniciens. L'UMR BF2I est intégrée dans le Département Biosciences, qui est organisé en deux filières de formation : la filière Biochimie & Biotechnologies et la filière BioInformatique & Modélisation.

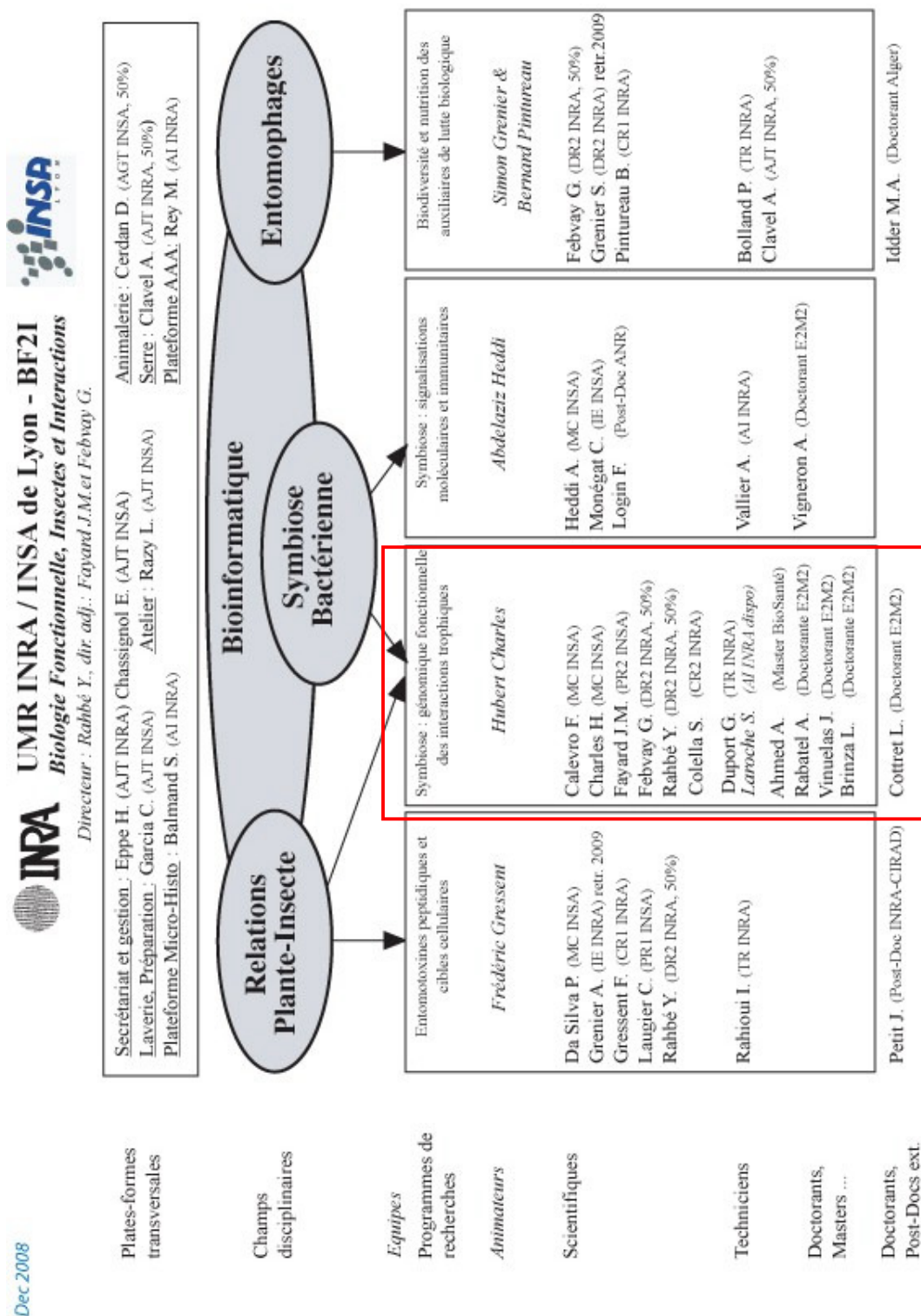
L'INRA (Institut National de la Recherche Agronomique) a été créé en 1946 après la Seconde Guerre Mondiale pour redynamiser et moderniser l'agriculture française.

Aujourd'hui, l'INRA contribue aux principales avancées dans les domaines agronomique et agro-alimentaire. C'est le premier institut de recherche agronomique en Europe et le deuxième dans le monde. L'INRA mène des recherches finalisées pour une alimentation adaptée, pour un environnement préservé et pour une agriculture compétitive et durable.

Les thèmes de recherche sont sans cesse en évolution en fonction des problèmes et/ou des évolutions souhaitées par les acteurs de la production agricole. L'institut met son savoir et son expertise au service de la décision publique.

Le laboratoire BF2I accueille une trentaine de personnes dont 12 entre chercheurs et enseignants-chercheurs, 11 ingénieurs et techniciens, 2 secrétaires et de nombreux étudiants. Les recherches conduites concernent la physiologie des insectes et sont focalisées sur l'analyse des interactions complexes avec leurs symbiotes, leurs parasites et les plantes. Ces connaissances contribuent à une approche intégrée de la protection des plantes contre les insectes ravageurs pour le développement d'une agriculture durable, respectueuse de l'environnement et de la santé humaine.

Pendant mon stage, j'ai travaillé dans l'équipe « Symbiose : génomique fonctionnelle des interactions trophiques » (*Symtrophique*), dont le principal intérêt est d'étudier la symbiose puceron/*Buchnera* d'un point de vue génomique et métabolique. L'organisation générale de l'UMR BF2I INRA-INSA de Lyon est reportée dans la figure 1 sur la page suivante.

**Figure 1 : Organigramme de la structure d'accueil.**L'équipe « *Symtrophique* » est encadrée en rouge. (source : BF21, déc. 2008)

2. Introduction

La relation symbiotique entre les pucerons et *Buchnera aphidicola* est l'un des modèles de symbiose le plus étudié à un niveau biologique. Cette symbiose est basée sur l'association entre un organisme eucaryote connu comme un important ravageur des cultures en zone tempérée, le puceron, et un organisme procaryote proche d'*Escherichia coli*, la bactérie du genre *Buchnera*. Au sein de l'équipe *Symtrophique* on s'intéresse plus particulièrement à l'analyse aux niveaux fonctionnel et évolutif des interactions trophiques dans la symbiose entre *Buchnera* et le puceron du pois.

Mon stage s'insère dans le projet *Aphicibles* pour lequel l'UMR BF2I a obtenu en 2007 un financement de l'Agence Nationale de la Recherche (ANR) dans le cadre du Réseau de Génomique Végétale *Génoplante*. Le titre complet du projet est : « *Symbiosis, digestion and reproduction as aphid physiological processes to identify new targets for insecticides* ». L'un des objectifs de ce projet est d'identifier des gènes cibles de la relation symbiotique que les pucerons entretiennent avec *Buchnera* afin de développer des stratégies de lutte biologique contre le puceron. Ce travail est actuellement possible grâce au développement de moyens d'analyses génomique et fonctionnelle mis au point ces dernières années. Les génomes du puceron du pois (www.aphidbase.com) et de sa bactérie symbiotique *B. aphidicola* APS (Shigenobu *et al.*, 2000) sont séquencés et présents dans les bases de données. Une base de données dédiée à l'annotation des voies métaboliques du puceron du pois vient d'être développée dans l'unité BF2I par Stefano Colella et Augusto Vellozo (<http://pbil.univ-lyon1.fr/software/cycads/acypicyc/home.html>).

2.1 A propos des pucerons

2.1.1 Classification et caractéristiques

Le puceron est un organisme invertébré appartenant à l'embranchement des **Arthropodes**, à la classe des **Insectes**, à l'ordre des **Hémiptères** et la famille des **Aphididae** (ACTA, 1982).

Sa taille varie de 2 à 5 mm de long et son corps est partagé en trois régions bien distinctes (tête, thorax, abdomen), comme schématisé dans la figure 2, qui représente une femelle parthénogénétique de puceron du pois (*Acyrtosiphon pisum*), le puceron étudié dans l'UMR BF2I.

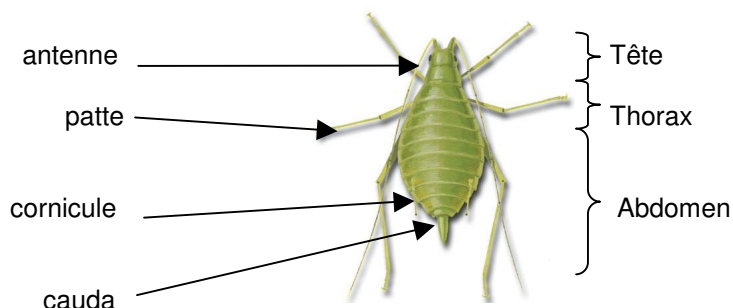


Figure 2 : Représentation schématique d'une femelle parthénogénétique aptère du puceron du pois.

Les 3 parties tête-thorax-abdomen sont distinctes et permettent d'affirmer l'appartenance à l'embranchement des arthropodes. Les 3 paires de pattes font du puceron un insecte caractérisé notamment par ses cornicules et sa cauda sur son abdomen. (source : animaldiversity.ummz.umich.edu)

Il possède également une paire d'antennes et des yeux composés (ocelles). Les antennes possèdent 6 articles au maximum, ses tarse ont 2 articles pourvus d'une paire de griffes pour le dernier. Trois paires de pattes sont présentes sur son thorax et il peut porter ou non (forme aptère) deux paires d'ailes. Les ailes apparaissent lors d'un stress ou d'une surpopulation sur une plante hôte. Un ensemble de gènes inactifs codant pour la formation d'ailes devient actif (le mécanisme moléculaire est peu connu), le puceron peut alors quitter la plante hôte pour aller en coloniser une autre (Schwartzberg *et al.*, 2008).

À l'extrémité de l'abdomen se trouve une sorte de queue, la cauda, qui sert à diriger l'écoulement du miellat, une substance sucrée qui sort de l'anus. Cet appendice facilite l'identification

des pucerons. Sur l'abdomen se dressent aussi, chez plusieurs espèces dont *A. pisum*, deux structures en forme de tubes qui portent le nom de cornicules, par lesquelles le puceron est capable de sécréter des phéromones sexuelles ou d'alarmes (*cf figure 2*).

Le développement du puceron est de type hémimétabole : les larves aux stades 1 (L1) , 2 (L2), 3 (L3) ou 4 (L4) sont morphologiquement semblables aux adultes (sauf si l'adulte présente des ailes) et se suivent l'une après l'autre suite à la ponte par la femelle. Les mues, ou exuviations, sont obligatoires pour la croissance de l'individu et se font par paliers depuis le stade L1 jusqu'au stade adulte. A chaque nouveau stade larvaire, une nouvelle cuticule est synthétisée à partir de l'ancienne. Elle assure une bonne imperméabilité à l'insecte et une résistance aux chocs mécaniques.

À tous les stades, les pucerons se nourrissent de la même manière et provoquent les mêmes types de dégâts.

2.1.2 Dégâts provoqués sur les cultures

La seule source alimentaire des pucerons est la sève élaborée (sève phloémienne) des végétaux, riche en sucres et très déséquilibrée en acides aminés. Les pièces buccales du puceron sont adaptées à ce mode de nutrition (rostre et stylet pour piquer dans la plante, en direction du phloème ; *cf figure 3*).

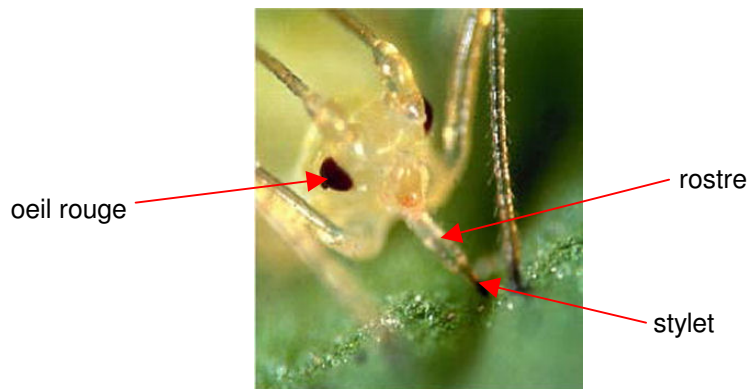


Figure 3 : Détail de l'avant du puceron du pois.

Le stylet, pièce buccale protégée par le rostre, est utilisé par le puceron pour piquer dans la plante et prélever de la sève phloémienne. (*source : www.carole-smadja.staff.shef.ac.uk*)

Environ 4400 espèces sont identifiées à ce jour (Geneci *et al.*, 2007), dont un peu plus de 600 en France. Ils sont généralement inféodés à une seule espèce végétale, mais certains font preuve d'une polyphagie étendue (Dedryver, 2007). En ce qui concerne *A. pisum*, plusieurs plantes hôtes sont tolérées par l'insecte : pois, fève, luzerne, ...

Les pucerons provoquent des ravages principalement par leur capacité à transmettre les maladies virales des plantes. Le virus est transporté de plante en plante lorsque le puceron pique une plante atteinte pour en piquer une nouvelle saine. Les dégâts directs causés par les pucerons peuvent être considérables : enrroulement des feuilles, retard de croissance, affaiblissement de la plante par perte de sève, avortement de la floraison ou encore fruits petits et malformés. Le miellat excrété par les pucerons cause aussi indirectement des dommages aux plantes hôtes : la substance riche en sucre favorise le développement des fumagines, entravant la respiration et la photosynthèse ou encore salissant les denrées consommables (Dedryver, 2007).

2.1.3 Cycle de vie des pucerons

Les pucerons mâles ainsi que les femelles sexuées n'existent que pendant une courte période de l'année. En effet, les femelles asexuées (parthénogénétiques) donnent naissance à des mâles et à des femelles sexuées juste avant l'arrivée de l'hiver (génération amphisexuelle). Une fécondation est alors possible en automne et les œufs pondus éclore au retour des beaux jours, généralement en même temps que le débourrage des bourgeons, pour donner des femelles qui se reproduiront de

nouveau par parthénogenèse (générations monosexuelles). Le cycle de vie des pucerons est détaillé dans la figure 4.

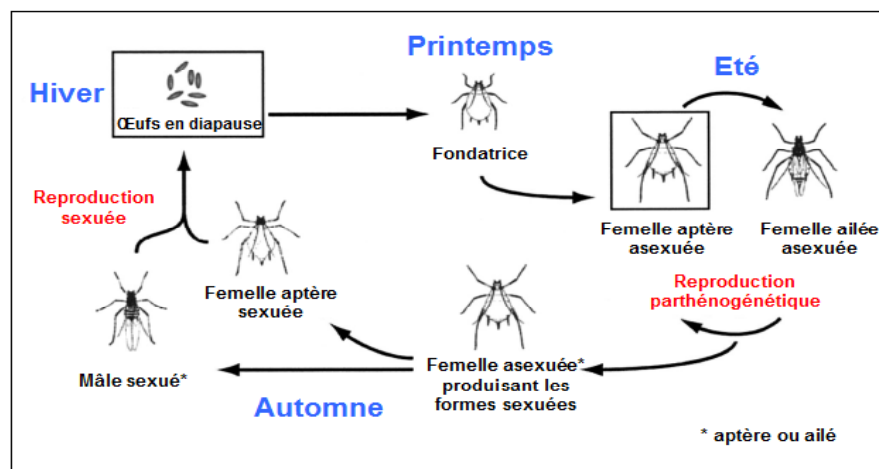


Figure 4 : Schéma du cycle de vie du puceron du pois *Acyrtosiphon pisum* illustrant le mode de reproduction (parthénogénétique et sexuée) en fonction des saisons.

A la fin de l'automne, des formes sexuées sont produites pour former les œufs d'hiver qui éclosent au début du printemps pour donner des femelles à reproduction parthénogénétique. (source : modifié d'après Miura *et al.* 2003)

2.2 A propos de *Buchnera*

B. aphidicola est la principale bactérie endosymbiotique des pucerons. Elle appartient à l'embranchement des protéobactéries, la classe des gamma protéobactéries, l'ordre des entérobactéries et la famille des enterobacteriaceae (Buchner, 1965, Baumann, 1995).

Les symbiotes du puceron sont hébergés dans des cellules spécialisées d'origine eucaryote, les bactériocytes (Baumann, 2005). Ces derniers sont regroupés dans une structure appelée bactériome qui est située à proximité des ovarioles (chaînes ovariennes du puceron), dans la cavité abdominale (Wilkinson *et al.*, 2003). *Buchnera* est transmise verticalement de la mère à l'embryon dans le cas de reproduction parthénogénétique (Wilkinson, 2003).

L'adaptation du puceron à une source nutritive aussi déséquilibrée et variable comme la sève phloémienne des plantes n'a pu se faire que grâce à la symbiose obligatoire avec cette bactérie spécialisée dans la complémentation nutritionnelle. L'association entre *Buchnera* et les pucerons remonterait à environ 150 millions d'années et se serait établie très tôt dans l'histoire de ce groupe d'insectes (Herbeck, 2005). On pense que l'hôte et son symbiote auraient évolué conjointement jusqu'à devenir complètement interdépendants (Baumann 2005). Ainsi, *Buchnera* n'est pas cultivable en dehors de son hôte et le traitement antibiotique des pucerons, utilisé pour les rendre aposymbiotiques, provoque des troubles du métabolisme, du développement, de la reproduction et de la survie de l'insecte (Wilkinson *et al.*, 1998, Douglas *et al.*, 2003).

De nombreuses études nutritionnelles (Febvay *et al.*, 1995 ; Febvay *et al.*, 1999) et les données génomiques ont bien montré que la base de cette interdépendance est métabolique et le cas des voies de biosynthèse des acides aminés est souvent reporté comme exemple. Certains gènes intervenant dans le métabolisme des acides aminés essentiels ne sont présents que dans le génome procaryote et la bactérie symbiotique fournit au puceron les acides aminés essentiels qu'il n'est pas capable de synthétiser lui-même. D'autre part, le puceron fournit à *Buchnera* les acides aminés non essentiels dont les voies de biosynthèse ont été perdues chez la bactérie (figure 5, Zientz *et al.*, 2001, Moran & Degnan, 2006). Enfin, les gènes codant les transporteurs d'acides aminés étant également absent dans le génome très réduit de la bactérie, le puceron fournit très probablement les transporteurs nécessaires aux échanges trophiques entre les deux organismes.

L'équipe « Symtrophique » est particulièrement intéressée à la découverte des bases moléculaires du fonctionnement du couple puceron/*Buchnera* et des voies-clés du métabolisme symbiotique. Grâce à l'analyse jointe des génomes du puceron et de la bactérie, un groupe de gènes

d'intérêt a été choisi chez l'organisme hôte afin d'être inactivé pour tester son importance dans le métabolisme symbiotique.

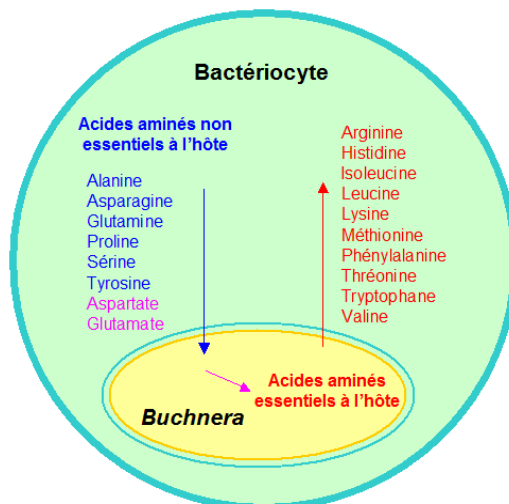


Figure 5 : Acides aminés non essentiels et essentiels à *A. pisum*.

Les acides aminés non essentiels (en bleu dans la figure) sont prélevés par le puceron dans la sève et sont acheminés jusque dans le bactériome, où *Buchnera* les transforme en acides aminés essentiels (en rouge) puis les rend ensuite au puceron. En rose sont représentés les acides aminés (aspartate et glutamate) qui, associés à d'autres précurseurs d'acides aminés, sont spécifiquement utilisés par *Buchnera* pour synthétiser les acides aminés essentiels au puceron. (source : adapté de Zientz *et al.*, 2001)

2.3 L'approche RNAi chez le puceron

Le mécanisme d'action des ARN interférants correspond à un mécanisme naturel de défense de la cellule face à une invasion par des agents étrangers comme des virus.

Suite à l'introduction d'ARN double-brin (dsRNA) dans les cellules (*cf figure 6*), de petits fragments d'une vingtaine de résidus (siRNA) sont obtenus par l'action de l'enzyme DICER (RNase de type III clivant l'ARN double brin). Le complexe RISC (RNA-Induced Silencing Complex), associé à un fragment ARN inhibiteur, l'apporte jusqu'à un ARNm cible, portant une séquence complémentaire à l'ARNi. Le fragment interférent s'hybride à l'ARN cible et cause la dégradation des ARNm par des nucléases, activées lorsque les complexes RISC catalysent une réaction de transport des ARNi. Les petits fragments clivés d'ARNm ne peuvent alors pas donner de protéines fonctionnelles.

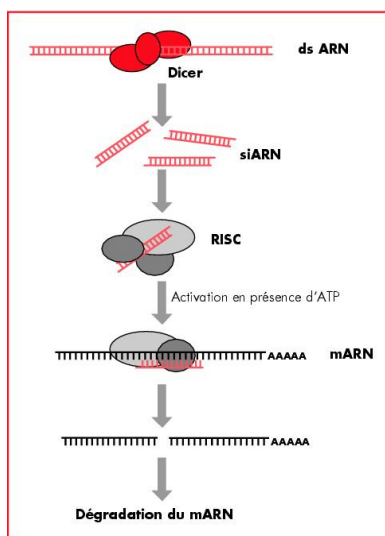


Figure 6 : Principe du mode d'action de l'ARNi par introduction expérimentale d'ARN double brin.

L'ARN double brin (dsARN) une fois dans la cellule est clivé par DICER en petits fragments (siARN) pris en charge par RISC. Ceux-ci reconnaissent une séquence d'ARNm spécifique et s'hybrident, inhibant la traduction. Les ARNm hybridés aux siARN sont alors dégradés par des nucléases. (source : www.john-libbey-eurotext.fr)

L'exploitation de ce mécanisme naturel au travers de techniques de biologie moléculaire constitue un nouveau moyen d'inactivation des gènes dans les cellules eucaryotes. L'utilisation de l'interférence ARN comme moyen de protection des cultures est récente. Des plants de maïs transgéniques exprimant l'ARN interférant dans leurs racines assure leur propre résistance contre certains nématodes du sol (Baum *et al.*, 2007).

Afin de rechercher des gènes essentiels à la survie du couple symbiotique puceron/*Buchnera*, l'équipe *Symtrophique* a choisi d'inactiver les gènes cibles par la technique de l'interférence par l'ARN. Cette technique a déjà été adaptée au puceron du pois dans d'autres laboratoires ou certains gènes (les gènes codant la cathepsine et la calréticuline par Jaubert *et al.*, 2007 et l'aquaporine par Shakesby *et al.*, 2008) ont pu être inactivés. Cependant, dans le cas de l'étude de l'ARN interférence dans l'UMR BF2I, les travaux se différencient des autres dans la mesure où l'expression des gènes ne sera pas étudiée à l'échelle du puceron entier (séparation des tissus d'étude pour rechercher l'effet systémique ou ciblé de l'ARN interférence) et les gènes ciblés seront des gènes intervenant dans le métabolisme symbiotique.

Une chute de l'expression de gènes essentiels à la survie du couple puceron/*Buchnera* sera intéressante dans la mesure où le métabolisme nutritionnel est affecté et peut conduire à des perturbations phénotypiques ou pouvant devenir létales pour le puceron.

3. Objectifs du stage

Le but de ce stage a été de réaliser une analyse transcriptomique et partiellement quantitative pour plusieurs gènes d'intérêt pour le laboratoire chez le puceron du pois *Acyrtosiphon pisum*. Une cartographie précise des sites d'expression de ces gènes n'étant pas reportée dans la littérature, il a fallu vérifier leur expression/faible expression ou non expression dans différents compartiments du puceron du pois. Cette caractérisation de l'expression génique est essentielle en vue des expériences d'interférence par l'ARN en cours de développement au laboratoire.

4. Matériel et méthodes

4.1 L'élevage d'*Acyrtosiphon pisum* à BF2I

L'élevage des pucerons (clone LL01-b, dépourvu de bactéries secondaires) s'effectue sur des plants de fève (*Vicia faba*) et dans un insectarium (cf figure 7) dont les caractéristiques sont les suivantes :

- 20 +/- 1 °C
- 70 +/- 5% d'humidité
- Photopériode : 16h jour-8h nuit.

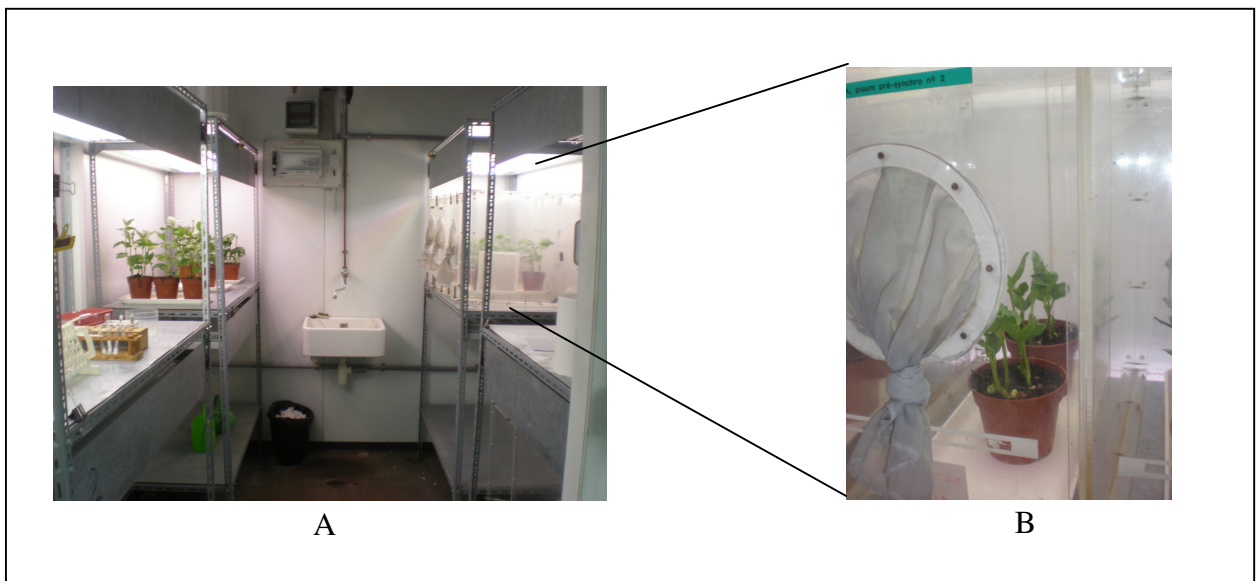


Figure 7 : Cellules d'élevage des pucerons.

A : vue générale de l'insectarium ; B : détail d'une cage d'élevage contenant les pucerons sur les plants de fèves (photographies personnelles)

Dans ces conditions, les pucerons se reproduisent par parthénogenèse (cf figure 8) et produisent donc des clones. Il faut entre 7 et 8 jours pour qu'une larve au stade L1 devienne un adulte, capable de se reproduire à son tour.



Figure 8 : Femelle parthénogénétique donnant naissance à une larve.

La larve pondue au stade L1 est autonome et devient un adulte capable de se reproduire à son tour 7 à 8 jours après la ponte. (source : <http://mentalfloss.cachefly.net>)

4.2 Sélection de gènes impliqués dans la symbiose puceron/*Buchnera*

La première étape de ce projet a été de définir les gènes sur lesquels l'étude allait être réalisée. J'ai tout d'abord sélectionné les gènes inactivés par RNAi chez le puceron du pois par d'autres groupes de recherche. J'ai, par la suite, focalisé mes recherches sur des gènes codant pour des transporteurs ou encore des enzymes impliqués dans le métabolisme des acides aminés. De plus,

d'autres gènes ont été sélectionnés d'après des études réalisées chez la drosophile (gènes létaux si inactivés par RNAi). Afin d'obtenir les informations nécessaires à la sélection des gènes d'intérêt, les travaux se sont appuyés sur les renseignements contenus dans la base de données développée par Stefano Colella et Augusto Vellozo appelée *AcypiCyc*. Chaque gène est annoté de la façon suivante : #ACYPIxxxxxx afin d'être facilement retrouvable dans la base de données.

- Les gènes suivants ont déjà pu être inactivés par RNAi dans d'autres laboratoires travaillant également sur le puceron du pois :

➔ **Cathepsine** #ACYPI006974 (Jaubert *et al.* 2007)

C'est une protéase qui tient une place importante dans la dégradation des protéines par le lysosome.

➔ **Calréticuline** #ACYPI002622 (Jaubert *et al.* 2007)

Cette protéine intervient dans le stockage du calcium dans le réticulum endoplasmique.

➔ **Aquaporine-4** #ACYPI006387 (Shakesby *et al.* 2008)

C'est une protéine transmembranaire qui permet la diffusion des molécules d'eau à travers les membranes biologiques tout en empêchant les ions de pénétrer dans la cellule.

- Les gènes présentés ci-dessous ont été sélectionnés pour leur importance dans le métabolisme du puceron du pois :

➔ **GS2** (*Glutamine Synthétase 2*) #ACYPI001461 et #ACYPI006239

Cette enzyme joue un rôle important dans le métabolisme de l'azote en catalysant la transformation du glutamate en glutamine ($\text{glutamate} + \text{ATP} + \text{NH}_3 \rightarrow \text{Glutamine} + \text{ADP} + \text{phosphate} + \text{H}_2\text{O}$). Ce gène est présent en plusieurs copies homologues dupliquées au cours du temps dans le génome du puceron du pois (paralogues), deux de ces paralogues sont étudiés ici.

➔ **Henna** #ACYPI007803

Ce gène code pour la phénylalanine 3 hydroxylase. Elle permet la transformation de la phénylalanine (acide aminé essentiel) en tyrosine, grâce au cofacteur BH₄, la tétrahydrobioptérine. ($\text{Phe} + \text{OH} + \text{BH}_4 \rightarrow \text{Tyr}$)

➔ **Cystathionine γ -lyase** #ACYPI000593

Cette enzyme transforme la cystathionine en cystéine et α -kétobutyrate (cystathionine \rightarrow cystéine + α -kétobutyrate)

➔ **MC** (*Mitochondrial Carrier*) #ACYPI007990

Ce transporteur protéique assure le passage de composés dans la mitochondrie. On suppose qu'il joue un rôle dans le transfert de l'oxaloacétate, métabolite intermédiaire intervenant dans le cycle de Krebs.

➔ **AGAP** (pour *Anopheles gambiae Protein*) #ACYPI008372

Gène codant pour une transaminase dont le rôle est de transformer un acide aminé en un autre. ($\text{L-leucine} + 2\text{-oxoglutarate} \rightarrow 4\text{-methyl-2-oxopentanoate} + \text{L-glutamate}$).

Ce gène a initialement été identifié chez le moustique *Anopheles gambiae*. Une recherche d'homologie a été faite avec le génome du puceron du pois. La séquence la plus homologue obtenue a été nommée AGAP.

- Deux gènes potentiellement létaux si inactivés ont également été sélectionnés :

➔ **VacATPase** (*Vacuolar ATPase*, Baum *et al.*, 2007) #ACYPI003170

Les sous unités protéiques produites par ce gène participent à l'élaboration de l'ATP translocase, protéine transmembranaire mitochondriale permettant l'entrée d'ADP dans l'organe pour sa transformation en ATP.

➔ **ANT2** (*Adenine Nucleotide Transporter 2*) #ACYPI008050

Ce gène code pour la formation des transporteurs des nucléotides adénilyques dans la membrane interne de la mitochondrie. Cette protéine permet l'échange d'ATP et d'ADP entre le cytoplasme et la mitochondrie.

- Enfin, un gène dit « de normalisation » a été retenu pour son utilité lors des expériences de PCR quantitative (gène de référence, connu pour être très exprimé chez les insectes) :

➔ **GAPDH** (*Glycéraldéhyde 3 phosphate dehydrogénase*) #ACYPI009769

L'enzyme produite participe à la 6^e étape de la glycolyse (glycéraldéhyde 3 phosphate → glycérate 1-3 biphosphate)

4.3 Définition des amorces

Les séquences nucléotidiques des gènes ont été obtenues sur la base des informations contenues dans la base *AphidBase* (<http://www.aphidbase.com/aphidbase/>). A partir des séquences des gènes sélectionnés, il a fallu élaborer la composition des amorces spécifiques à ceux-ci pour la réalisation du travail pratique. Pour cela, l'utilisation du logiciel *Oligo 6.8* permet de répondre à nos attentes. Une fois la séquence chargée dans le programme, les paramètres sont définis afin d'obtenir des propositions de plusieurs paires d'amorces possibles pour chaque gène. Les amorces utilisées pour l'amplification ont été conçues de façon à pouvoir amplifier de courtes portions de chacun des gènes choisis (la taille des fragments amplifiés étant comprise entre 93 et 184 paires de bases pour répondre aux contraintes imposées lors de la réalisation de la qRT-PCR). Afin d'obtenir des amorces spécifiques et stables, les critères optimaux suivants ont été programmés :

- Amorces s'hybridant au gène plus près de l'extrémité 3' que 5'.
- Non repliement de l'amorce sur elle-même.
- Pas d'appariement des amorces sens et antisens entre elles
- Amorces ni trop courtes (non spécificité), ni trop longues (risque d'appariement d'une séquence sur elle-même ou avec l'autre amorce) : environ 20 bases.
- T_m (*melting Temperature*) proches entre les 2 amorces d'une même paire.

Les séquences des amorces choisies, fabriquées par la société *Eurogentec* (*Eurogentec*, Seraing, Belgique), sont indiquées dans le tableau 1.

Tableau 1 : Séquences des amorces utilisées.

Les séquences oligonucléotidiques sens (Forward, F) et antisens (Reverse, R) sont données pour chaque gène. Le fait d'avoir ou non des amorces annotées R2 et F2 signifient qu'il a fallu tester d'autres amorces que celles initialement prévues (R1 et F1) puisqu'elles ne donnaient pas d'assez bons résultats.

gène	nom amorces	séquences amorces 5'=>3'	gène	nom amorces	séquences amorces 5'=>3'
<i>comGS2</i>	cGS2_R1	TCG-ATA-CCA-AAC-CAC-GG	<i>Vacuolar ATPase</i>	vacATP_R1	GTT-ATC-CAT-GCG-AGC-ACG-AT
	cGS2_F1	CTC-AAG-GAG-AAA-ACT-CGG-ATA		vacATP_F1	GCC-AAT-TCC-ATT-ACG-GTG-TTT
	cGS2_R2	ATG-TCA-CGT-CCC-TAC-ACT-TTA	<i>Cathepsine</i>	cath_R1	TGA-TTT-ACA-TAC-AAT-GCG
	cGS2_F2	TGG-CCA-TTT-TTA-ACG-ACC-C		cath_F1	TTA-TTG-TGT-CAT-TTA-TGG-TTA
<i>onlyGS2</i>	oGS2_R1	CTT-TGT-ATG-GGT-CGC-AGT-T		cath_R2	CGA-CAA-TTT-TTA-TCA-TTA-TCA
	oGS2_F1	GTG-TAC-GAT-CCC-AAC-GAA		cath_F2	TTG-TCA-AAG-ACT-AGA-TAT-TAA
	oGS2_R2	CAG-AAC-AAC-CAC-GAG-GAA-TA	<i>Mitochondrial Carrier</i>	MC_R1	ATT-GGG-ATT-ACC-GAT-TTA-CAC
	oGS2_F2	AGG-CTA-TTG-AAA-AAT-TGT-CCA		MC_F1	GGG-ACA-GGT-TGC-GAC-A
<i>Henna</i>	henna_R1	AAC-TAA-ATT-AAA-CGC-AGT-A		MC_R2	CAT-CAG-GAA-CTT-TAC-CTA-TAC
	henna_F1	TGA-AAC-CGA-ACG-AG		MC_F2	AGC-CAT-GCA-GAG-TCT-TTG
<i>Cystathionine</i>	cyst_R1	TCT-AAG-TCG-TCG-ATC-AAG-TCC	<i>GAPDH</i>	glyc_R1	ATC-GCA-ACT-ATT-AGT-AGT-AGC
	cyst_F1	ATT-GTC-CCG-ATT-CCC-A		glyc_F1	AAT-TTC-ATT-GAA-CGA-CC
	cyst_R2	CCA-CTT-GCT-TGA-ATT-GCT		glyc_R2	CAA-AAA-TAT-TGA-TGA-TAG-GGA
	cyst_F2	GAA-GCC-ACA-AAA-TAT-AAT-ACC		glyc_F2	CGA-CCA-ATT-TGT-CAA-ACT-TAT
<i>AGAP</i>	AGAP_R1	TGA-TTT-TTA-CTT-TGC-GGA-CT	<i>Aquaporine-4</i>	aqp_R1	CAT-ATT-GAA-TTA-GAC-GCT-GGT
	AGAP_F1	TGG-CTT-CAA-CTA-ACT-ACC-AAC		aqp_F1	CCT-ATT-GTC-GGT-GGC-ATA-C
<i>ANT2</i>	ANT2_R1	GTT-GGA-GAA-TGC-ACC-CTT		aqp_R2	GGT-GGG-CGG-CAG-CAA
	ANT2_F1	CCA-ACG-CAT-GTA-TAA-GAG-CAC		aqp_F2	AGC-CAA-CCG-AAG-CAA-CAT-AGT-T
<i>Calréticuline</i>	calr_R1	TAC-AAA-TGT-ACA-AGC-CAT-AA			
	calr_F1	GAA-AAA-TTC-CTC-CTA-CTT-AAA			

En ce qui concerne le gène *GS2*, deux types d'amplification ont été testés. En effet, ce gène est présent en plusieurs copies dans le génome (4 paralogues). Les amorces appelées *cGS2* permettent d'amplifier des fragments identiques sur 2 des 4 paralogues proches l'un de l'autre alors que les amorces *oGS2* ne permettent de toucher dans le génome qu'un seul de ces 2 gènes paralogues étudiés sur 4.

4.4 Dissection du puceron

Afin de récupérer les différents compartiments du puceron, une dissection à partir d'un seul individu adulte a été réalisée. Celle-ci se réalise sous loupe binoculaire, à l'aide de pinces fines et dans du tampon A DEPC (composition donnée en annexe 1) contenu dans une petite boîte de Pétri au fond gélosé (1%). On récupère tout d'abord la tête par décapitation, puis on retire la cauda pour dérouler le tube digestif entier. Après ouverture de l'abdomen, les chaînes ovariennes constituées d'embryons en formation sont récupérées. A l'aide d'une petite pompe, on aspire les bactériocytes avec le tampon que l'on place dans un tube *Eppendorf*. Enfin, tout ce qui reste (carcasse) est également récupéré. La figure 9 représente plus précisément le matériel biologique prélevé.

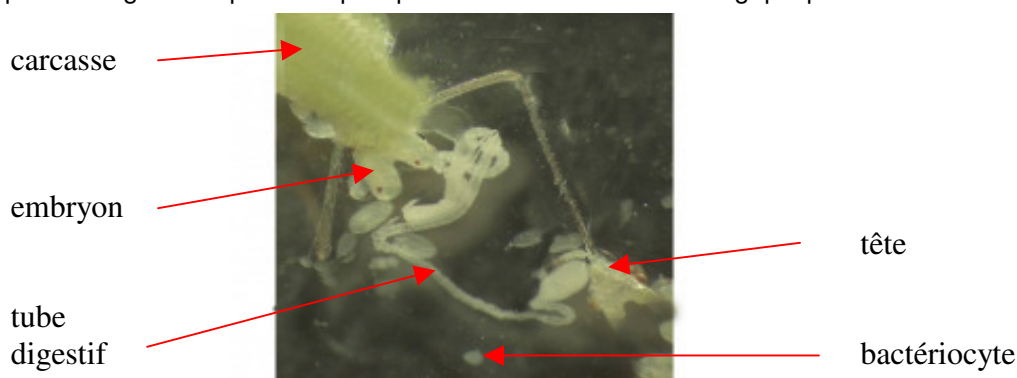


Figure 9 : Les 5 compartiments du puceron récupérés.

Après décapitation et retrait de la cauda, le tube digestif est tiré et déroulé délicatement. L'ouverture de l'abdomen permet l'accès aux embryons et bactériocytes. La carcasse est récupérée en dernier. (source : www.angeladouglasslab.com)

Tête, embryons, tube digestif et carcasse sont placés dans 300µL de *RNA Later* jusqu'au démarrage de l'extraction des ARN totaux. Cette solution commerciale (*Ambion*, Courtaboeuf, France) stabilise et protège les ARN de la dégradation.

4.5 Extraction des ARN à partir des 5 compartiments tissulaires du puceron

Les ARN totaux de chaque partie du puceron disséqué sont isolés avec le Kit *RNeasy* (QIAGEN, Hilden, Allemagne), en utilisant le protocole « RNA cleanup ». Les échantillons sont d'abord traités au β -Mercaptoéthanol 1 % dans du tampon RLT et homogénéisés ; puis incubés pendant 5 minutes dans du tampon TE. Après ajout d'un volume d'éthanol absolu, les échantillons sont soumis à différentes étapes de purification sur colonnes *RNeasy* fournies dans le kit. L'ARN total est finalement élué dans 30 µl d'eau *RNase free* (indemne de ribonucléases). Le protocole complet est donné en annexe 2. A la fin de la manipulation, il est nécessaire de vérifier la concentration et la qualité des ARN extraits.

4.6 Dosage au Nanodrop

Les ARN totaux extraits sont ensuite dosés grâce à un spectrophotomètre appelé *Nanodrop*. (cf figure 10)



Figure 10 : Le Nanodrop.

Ce spectrophotomètre peut effectuer des mesures d'absorbance à 230, 260 et 280nm à partir d'un faible volume de solution à titrer. (photographie personnelle)

Seulement 1.5µL de suspension suffit pour quantifier et connaître le degré de pureté des acides nucléiques. Ce spectrophotomètre possède la particularité d'avoir une sensibilité minimale (4ng/µL) supérieure à celle d'un appareil classique (100ng/µL). Un « blanc » est tout d'abord réalisé avec la solution utilisée pour éluer l'ARN au cours de l'extraction (eau RNase-free). La détermination des concentrations pour les 5 compartiments cellulaires se réalise dans un second temps. Les mesures réalisées permettent aussi d'estimer le degré de pureté des acides nucléiques. Des mesures d'absorbance à 260nm (domaine d'absorption des acides nucléiques) et à 280nm (domaine d'absorption des protéines) permettent de calculer le rapport A_{260}/A_{280} . Pour une solution d'ARN, on considère que le degré de pureté est bon lorsque ce rapport est situé entre 1,9 et 2. De même, l'appareil effectue une mesure à 230nm et le rapport A_{260}/A_{230} permet d'estimer le niveau de contamination par les composés utilisés pendant la purification (β-Mercaptoéthanol et éthanol).

4.7 Vérification de l'intégrité des ARN

Avant de réaliser la rétrotranscription, une analyse de l'intégrité des ARN ribosomiques (qualité) est réalisée grâce à un bioanalyseur fonctionnant sur le principe d'un électrophorèse capillaire.

Les différents échantillons sont déposés sur une puce appelée *RNA Nanochip*, composée de plusieurs puits, dont 12 destinés aux échantillons, et 1 au marqueur de poids moléculaire (cf figure 11)

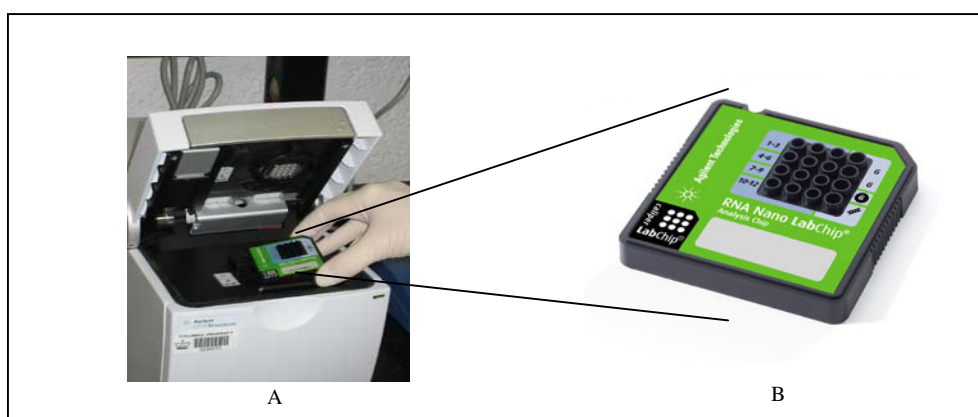


Figure 11 : Bioanalyseur Agilent 2100 et sa puce RNA Nano LabChip.

A : Bioanalyseur Agilent 2100 ; B : puce RNA Nano LabChip. (sources : www.montana.edu et www.umbi.umd.edu)

Au niveau de ces puits, il existe des microréseaux de capillaires. On dépose d'abord un gel filtré et mélangé à un intercalant de l'ARN spécifique et fluorescent (RiboGreen). Celui-ci est réparti équitablement au niveau de chaque puits, et remplit les microréseaux. Un tampon est alors ajouté dans chaque puits, afin de placer ensuite les échantillons et le marqueur de poids moléculaire dans un milieu stable, à un pH donné. Les échantillons d'ARN sont chauffés à 70°C pendant 2 minutes afin de détruire les éventuelles structures secondaires causées par appariements intramoléculaires. La puce est vortexée afin d'homogénéiser le tampon et les échantillons, puis placée dans l'appareil. Les puits sont analysés un par un, en commençant par le marqueur de PM, qui sert d'étalon aux niveaux

qualitatif et quantitatif. Une électrode est en contact avec chaque puits. Au moment de l'analyse, cette électrode est soumise à un haut voltage, qui va permettre une séparation très rapide des brins d'ARN de l'échantillon en fonction de leur taille (passage à travers le gel, au sein des microréseaux plus ou moins rapide). Au moment de leur passage dans le gel, les molécules d'ARN vont se lier spécifiquement à l'intercalant. En fin de course (fin de colonne, fin du microréseau), les molécules sont détectées par fluorescence. Les molécules sont excitées par un rayonnement UV, et seuls les ARNs liés au SYBR Green vont ré-émettre un rayonnement fluorescent.

L'appareil mesure, en temps réel le temps de rétention de l'échantillon dans le gel et l'intensité de fluorescence associée à chaque échantillon :

- Plus les ARN sont courts, plus ils migrent rapidement et donc plus leur temps de rétention est faible.
- Plus l'intensité de fluorescence est importante, plus la quantité d'ARN est importante.

Ces données qualitatives (temps de rétention plus ou moins long en fonction de la taille des ARN) et quantitatives (intensité de fluorescence) sont validées par rapport au marqueur de poids moléculaire qui est connu très précisément par le logiciel. Le bioanalyseur *Agilent 2100* est utilisé au BF2I pour vérifier la qualité des ARN. Dans les ARN eucaryotes (issus de la tête, de la carcasse et du tube digestif), deux pics sont individualisés (18S et 28S) tandis que pour les bactériocytes et les embryons contenant les bactéries symbiotiques, on s'attend à trouver en plus les pics d'ARN 16S et 23S puisque le matériel biologique est à la fois eucaryote et procaryote. La figure 12 donne plusieurs profils pouvant être obtenus à partir d'ARN eucaryote de différentes qualités.

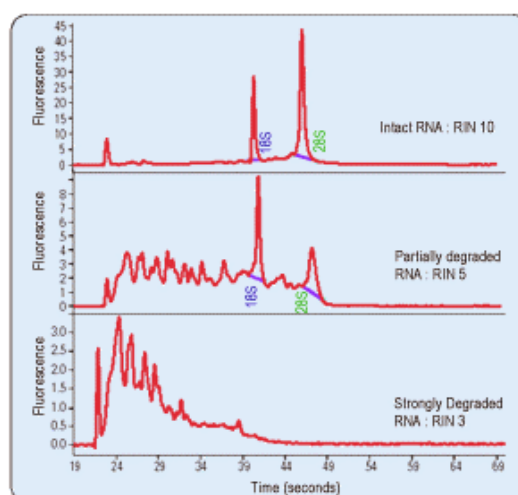


Figure 12 : Exemples de profils sur des ARN eucaryotes (18 et 28 S).

Du haut vers le bas, la qualité des ARN se dégrade. Deux pics 18S et 28S uniques et lisses assurent une bonne qualité du matériel. Les multiples pics rapprochés apparaissant à partir du 2^{ème} profil correspondent à des petits fragments d'ARN générés lors du processus de dégradation. (source : <http://www.interchim.com>)

4.8 RT-PCR

4.8.1 Rétrotranscription des ARNm

L'étape de rétrotranscription ou transcription inverse permet d'obtenir de l'ADNc (ADN complémentaire) à partir de l'ensemble des ARN exprimés dans un tissu donné.

Les échantillons d'ARN sont tout d'abord traités avec l'enzyme DNase I (kit et protocole fournis par *Promega*, Charbonnières les Bains, France) afin d'éliminer toute trace d'ADN apportée pendant l'extraction des ARN.

La réaction de rétrotranscription peut ensuite être réalisée. Pour cela, un mix est préparé contenant, des oligos dT, des inhibiteurs de RNases, un mélange de dNTPs, de l'eau et le tampon spécifique à l'enzyme de rétrotranscription en suivant les instructions fournies par le fabricant du kit *Sensiscript* (QIAGEN, protocole du fabricant). Ce kit spécialement conçu pour de faibles quantités

d'acides nucléiques a été utilisé pour la première fois au laboratoire. L'ajout de *RNase OUT* permet d'inhiber l'activité d'éventuelles RNases présentes dans les tubes. A chaque échantillon d'ARN (10ng utilisé pour chaque réaction), on ajoute un volume fixe du mélange réactionnel suivant, comme indiqué le tableau 2 ci-dessous :

Tableau 2 : Mélange réactionnel pour rétrotranscription.

Réactifs	volume/réaction	concentration finale
Tampon RT 10X	2 µL	1X
dNTPs 5mM chacun	2 µL	0,5mM chacun
Oligo-dT 10µM	2 µL	1 µM
Rnase out (10U/µL)	1 µL	10U/réaction
ARN totaux	suivant concentration	20 ng
H ₂ O Rnase-free	qsp 19 µL	-

Après l'étape d'hybridation avec les Oligo-dT, les tubes sont placés à 37°C, avant d'ajouter 1µL d'enzyme. La réaction de transcription inverse se déroule pendant 1h. L'usage d'Oligo-dT permet de ne sélectionner que les ARNm dans le pool d'ARN totaux extraits (ARNm, ARNt, ARNr, ...). En effet, tous les ARNm sont caractérisés par la présence d'une queue polyA en 3'. Les Oligo-dT (Thymidines en chaîne) s'hybrident uniquement avec ces séquences, ainsi tout ce qui n'est pas ARNm n'est pas rétrotranscrit. La transcriptase inverse, qui est une ADN polymérase ARN-dépendante coulissera ensuite le long de l'hybride et synthétisera l'ADNc dans le sens 5'→3'. A la fin de la réaction, un hybride ARN-ADN est obtenu. L'utilisation d'une RNase H permet de détruire spécifiquement l'ARN lié à l'ADN (30min à 37°C). On obtient par conséquent de l'ADNc simple brin qui est conservé à -20°C ou utilisé directement pour la réalisation de la PCR (échantillons appelés « RT+ »)

Des témoins dits « RT- » ont également été réalisés en parallèle : ils sont obtenus de la même manière que les échantillons RT+ à l'exception que l'on ajoute 1µL d'eau à la place de la reverse transcriptase. Ces témoins négatifs seront utilisés pour les réactions de PCR, tout comme les échantillons rétrotranscrits RT+. La figure 13 ci-dessous résume les grandes étapes de la rétrotranscription pour un échantillon RT+.

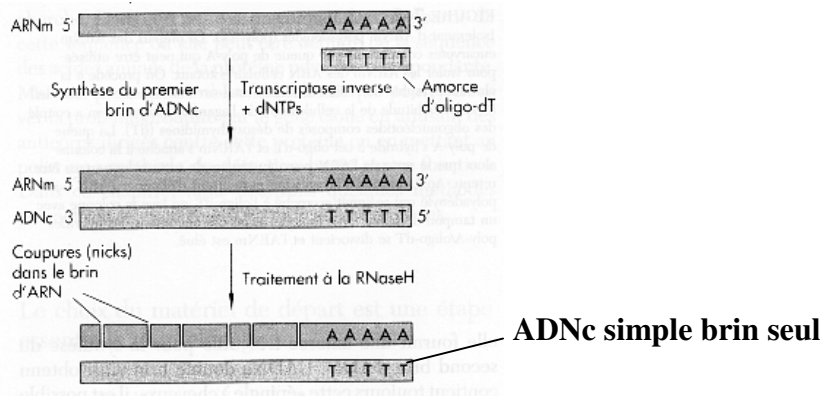


Figure 13 : La synthèse d'ADN complémentaire.

Une hybridation des oligo-dT aux ARNm permet l'initiation de la synthèse de l'ADNc. Un hybride ARN-ADN est alors obtenu après action de la transcriptase inverse. La RNase H permet de dégrader l'ARN lié à l'ADN pour finalement obtenir un ADNc seul simple brin. (source : adapté de <http://www.inra.fr/theses/theses-integrale/Theses/mbeugie/html/images/fig33.gif>)

4.8.2 PCR sur l'ADNc

A partir de l'ADNc de chaque tissu, la technique de PCR (Polymerase Chain Reaction) ou ACP (Amplification en Chaîne par Polymérase) permet une réplique ciblée *in vitro*. Elle permet d'obtenir, à partir d'un échantillon complexe et peu abondant, d'importantes quantités d'un fragment d'ADN spécifique et de longueur définie.

Le principe et les conditions expérimentales sont simples. Il s'agit de réaliser une succession de réactions de réplication d'une matrice double brin d'ADN. Chaque réaction met en œuvre les deux amorces oligonucléotidiques pré-établies dont les extrémités 3' pointent l'une vers l'autre. Elles définissent alors, en la bornant, la séquence à amplifier. Aujourd'hui, ce procédé révolutionnaire couplé à l'utilisation d'une ADN polymérase (*Taq polymérase*) thermorésistante permet d'obtenir, sans clonage, une amplification considérable d'un fragment donné d'ADN (de l'ordre du million de copies par heure). Le principe général de la PCR est schématisé dans la figure 14.

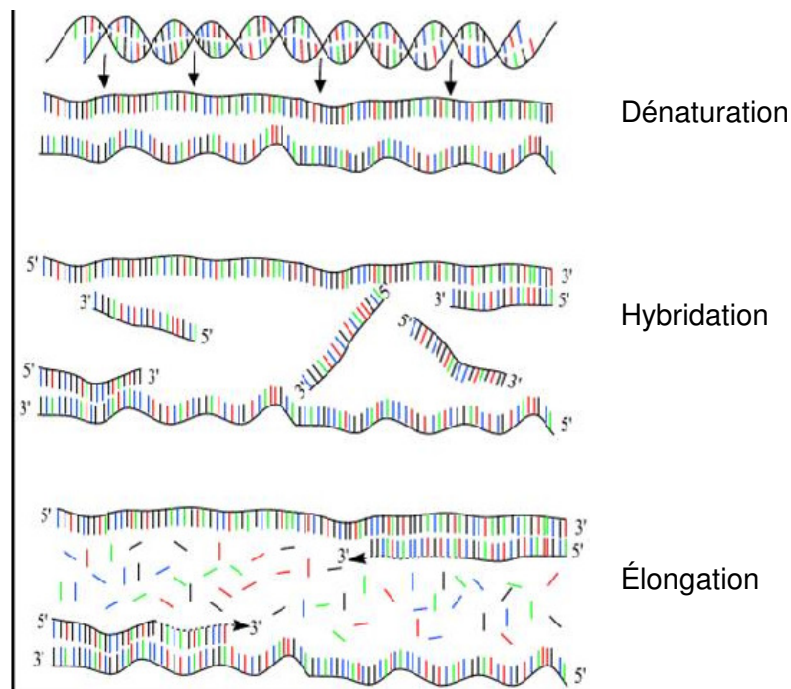


Figure 14 : Etapes d'un cycle de PCR.

La dénaturation (séparation des brins d'ADN), l'hybridation (appariements spécifiques des amorces à l'ADN dénaturé) et l'élongation (activité de la polymérase) constituent les étapes d'un cycle de PCR (source : adapté de <http://www.le.ac.uk>)

Plus spécifiquement, dans le cas de mon travail expérimental au laboratoire, les conditions suivantes ont été utilisées pour la réalisation de la PCR :

- L'**activation** de la *Taq polymérase* a été réalisée pendant 5 min à 94 °C ;
- La **dénaturation**, pour une dissociation complète des deux brins d'ADN, a été effectuée à 94 °C pendant 1 min ;
- L'**hybridation** des amorces dépend de leur T_m . De nombreux essais des amorces sur de l'ADNg de puceron ont dû être effectués afin de trouver la température d'hybridation optimale. Pour cela, des gradients de température ont dû être opérés pour chaque couple d'amorces ;
- L'**élongation** s'est déroulée à 72 °C pendant 1 min. Elle correspond à la température d'activité optimale de l'enzyme. Au cours de cette étape, les brins complémentaires d'ADN sont synthétisés à partir des extrémités 3' libres des amorces hybridées.

Les étapes de dénaturation, d'hybridation et d'élongation ont été répétées 35 fois en tout.

- Une unique phase de **terminaison** a été nécessaire (72 °C, 5 min) afin de compléter les brins d'ADN éventuellement incomplets.

La réaction de RT-PCR pour chacun des 5 compartiments analysés et pour chaque couple d'amorces a été mise en place en réalisant le mélange réactionnel suivant pour l'ensemble des amorces testées (tableau 3) :

Tableau 3 : Mélange réactionnel pour PCR.

Réactifs	Volume/réaction	Conditions finales/réaction
Tampon 10X	2 μ L	1X
dNTPs [10 mM]	0,25 μ L	125 μ M
MgCl ₂ [50 mM]	0,8 μ L	2 μ M
Amorce F [20 μ M]	2 μ L	2 μ M
Amorce R [20 μ M]	2 μ L	2 μ M
H ₂ O nuclease free	11,85 μ L	-
Taq UptiTherm 5U/ μ L	0,1 μ L	0,5 U/réaction
ADN matrice 15 ng/ μ L	1 μ L	15 ng
Volume final	20 μ L	-

Tous les réactifs sont fournis par *Interchim*, Montluçon, France. Des témoins négatifs (RT- et eau à la place de l'ADNc) et positifs (ADNg) ont également été réalisés. Le témoin à l'eau permet de vérifier la non-contamination des amorces par de l'ADN et le témoin RT- permet de prouver qu'il n'y a aucune trace d'ADN dans les ARN extraits. Enfin, le témoin positif à l'ADNg permet de s'assurer de la présence de la séquence ciblée dans le génome du puceron. Toutes ces étapes sont réalisées dans un thermocycleur *BioRad* (*BioRad*, Marnes-la-Coquette, France ; cf figure 15)

**Figure 15 : Thermocycleur 2 blocs BioRad.**

L'appareil effectue toutes les étapes des cycles de PCR automatiquement. (photographie personnelle)

Tous les produits de PCR et RT-PCR ainsi obtenus, ont été analysés par électrophorèse sur gel d'agarose. Cela nous a permis de vérifier si l'amplification était correcte (présence d'un fragment de la taille attendue) et spécifique (absence de produits secondaires d'amplification). Pour cela, on prépare un gel d'agarose 2% dans du TAE 1X (Tris Acétate EDTA). On incorpore 100 μ L de BET (bromure d'éthidium) à 50 μ g/mL pour 100mL de gel. Ce produit intercalant de l'ADN émet un rayonnement lorsqu'il est excité par les UV. Le gel est laissé à l'air libre pour sa polymérisation. On ajoute dans chaque échantillon 5 μ L de solution de dépôt (composition en annexe 3). Ce produit sert à alourdir la solution contenant l'ADN (facilite le dépôt dans les puits du gel) et permet de suivre le front de migration lorsque l'électrophorèse est lancée. Les produits de PCR ainsi qu'un marqueur de taille (*MassRuler DNA Ladder*, *Fermentas*, St-Rémy les Chevreuse, France) migrent pendant environ 20 min à 100V. Cette échelle permet de définir la taille approximative des produits de PCR ayant migré dans le gel : toute bande sur un même niveau horizontal possède une même taille. La révélation s'effectue dans un système clos composé d'une plaque éclairée aux UV et d'un système d'acquisition d'image.

4.9 qRT-PCR

La qPCR (*quantitative PCR*) appelée également PCR en temps réel repose sur la détection et la quantification d'un émetteur fluorescent ajouté pendant le processus d'amplification par PCR. Ainsi, l'augmentation du signal d'émission fluorescent est directement proportionnel à la quantité

d'amplicons produits durant la réaction. Dans mon cas, l'émetteur fluorescent utilisé pour la PCR en temps réel est le *SybrGreen I*, agent intercalant des bases d'ADN qui fluoresce en vert lorsqu'il est excité par une longueur d'onde de 480nm. Le mode d'action du *SybrGreen I* est donné par la figure 16.

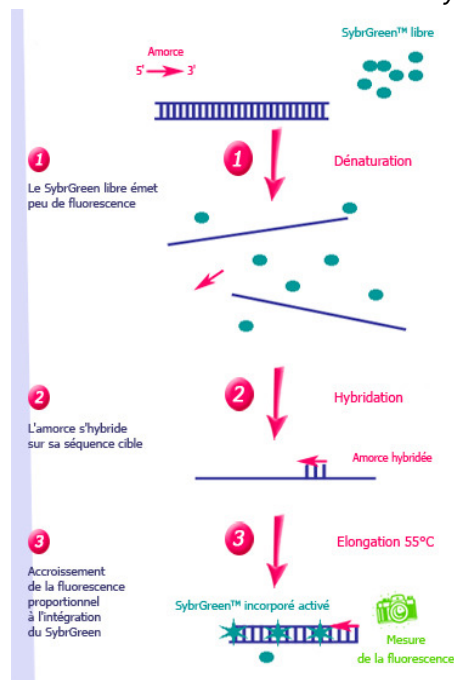


Figure 16 : Incorporation du *SybrGreen I* au cours d'un cycle de PCR.

Le *SybrGreen I* s'intercale entre les bases de l'ADN lorsque celui-ci est en état de simple brin (dénaturation préalable nécessaire). Après l'élongation par la polymérase, l'agent intercalant devient fluorescent lorsqu'il est activé par les rayonnements UV. La quantité de fluorescence émise est alors directement proportionnelle à la concentration en acides nucléiques. (source : www.ilm.pf)

Dans le cadre de mon stage, j'ai contribué à la mise au point des protocoles de RT-PCR quantitative sur trois des 11 gènes analysés par RT-PCR : les gènes *GADPH*, *Aquaporine-4* et *ANT2*. Pour chacun des gènes testés, on réalise un blanc (pas d'ADNc) et une gamme étalon de concentrations. Pour cela, les produits PCR pour chacun des 3 gènes sont tout d'abord purifiés sur colonne d'après le protocole fourni avec le kit (*GenElute PCR DNA Purification kit*, Sigma). Les concentrations obtenues sont mesurées au *Nanodrop*. Les 6 dilutions sont réalisées en cascade afin d'obtenir les 6 solutions suivantes : 2000 ; 200 ; 20 ; 2 ; 0,2 ; 0,02 fg/μL. Pour la RT-PCR proprement dite, pour chaque couple de gène/compartiments du puceron, tous les produits de RT sont dilués au 1/5^e et 3 répétitions ont été réalisées. Les quantités de chaque réactif sont données par le tableau 4.

Tableau 4 : Mélange réactionnel pour qRT-PCR.

Eau <i>nuclease free</i>	1,5 μL
Amorces 10 mM	0,5 + 0,5 μL
Mix SybrGreen (2X)	5 μL
Produits PCR/eau ou ADNc	2,5 μL
Vf = 10μL	

Le mix SybrGreen 2X (prêt à l'emploi) est fourni par Roche Diagnostics, Meylan, France (kit *LightCycler 480 SYBR Green I Master*). Il contient la Taq polymérase et son tampon, les dNTPs et le SyberGreen I. Les conditions d'amplification sont les suivantes : première dénaturation à 95°C pendant 5 minutes, puis 45 cycles d'amplification se composant chacun d'une dénaturation à 95°C pendant 15 secondes, d'une amplification à 49°C pendant 15 secondes (adaptée pour les 3 gènes) et enfin, d'une élongation à 72°C pendant 15 secondes. L'intensité de fluorescence obtenue pour chaque essai est ensuite comparée à celle obtenue avec la série de dilutions afin de quantifier les acides nucléiques présents dans les échantillons d'ADNc. Les réactions de PCR en temps réel ont été

menées dans des plaques 96-puits et dans un appareil *LightCycler 480* (Roche Diagnostics) (cf figure 17). Le protocole complet pour la préparation de la microplaque 96 puits est donnée en annexe 4.



Figure 17 : *LightCycler 480* (Roche).

Ce thermocycleur particulier est capable d'émettre des rayonnements UV pour activer le *SybrGreen I* qui est détecté quantitativement pour déterminer les concentrations en acides nucléiques. (photographie personnelle)

Pour comparer l'expression des gènes entre eux dans les différents compartiments, il est nécessaire de normaliser les résultats grâce à un programme d'analyses statistiques REST « Relative Expression Software Tool », <http://rest.gene-quantification.info/>. (Pfaffl *et al.* 2002). Pour cela, les CP (Critical Point) sont pris en compte. Ils correspondent aux temps des débuts des phases exponentielles des échantillons : plus le CP est petit, plus l'échantillon était concentré et inversement, un échantillon dilué aura un CP plus tardif. Le programme d'analyse REST permet de calculer automatiquement le ratio d'expression d'un gène test (*ANT2* et *Aquaporine-4*) par rapport au gène de normalisation (*GAPDH*) et à un tissu de référence dans lequel on retrouve une expression de tous les gènes sélectionnés (bactériocytes). Par conséquence, le programme d'analyse effectue un « ratio de ratio » : les données sont normalisées grâce au gène *GAPDH* et au tissu « bactériocytes ». par exemple, pour le gène *Aquaporine-4* (*Aqp*) dans l'intestin, le programme effectue le calcul suivant :

$$\text{Donnée normalisée} = \frac{\frac{\text{CP (Aqp)}_{\text{intestin}}}{\text{CP (GAPDH)}_{\text{intestin}}}}{\frac{\text{CP (Aqp)}_{\text{bactériocytes}}}{\text{CP (GAPDH)}_{\text{bactériocytes}}}}$$

5. Résultats et discussion

5.1 Dosage des ARN extraits

Les résultats du dosage des ARN au *Nanodrop* sont reportés dans le tableau 5 ci-dessous :

Tableau 5 : Résultats obtenus après dosage des ARN des 5 parties du puceron.

Echantillons	conc (ng/μl)	A ₂₆₀	A ₂₈₀	A ₂₆₀ /A ₂₈₀	A ₂₆₀ /A ₂₃₀	quantité (ng)
blanc	-0,24	-0,006	-0,008	0,73	1,37	-
Bactériocytes	16.79	0.420	0.20	2.06	0.56	478.5
Embryons	110.77	2769	1330	2.10	0.98	3156.9
Tube digestif	14.82	0.37	0.21	1.74	0.58	422.4
Tête	39.79	1.00	0.65	1.53	0.56	1134
Carcasse	12.34	0.31	0.18	1.70	0.35	351.7
blanc	-0,24	-0,006	-0,003	2,16	0,40	-

Deux répétitions pour chaque échantillon ont été effectuées, la moyenne pour chacun est représentée ici. Une mesure au début et à la fin avec l'eau utilisée pour l'élution de l'ARN permet de s'assurer d'une absence d'acides nucléiques avant le dosage ou de traces laissées sur l'appareil après utilisation.

Les résultats ci dessus montrent de très faibles concentrations obtenues, notamment pour les bactériocytes, le tube digestif et la carcasse, ce qui est tout à fait cohérent avec le fait d'extraire les ARN à partir d'un seul individu.

Le rapport A₂₆₀/A₂₈₀ est satisfaisant. Au contraire, le rapport A₂₆₀/A₂₃₀ n'est pas optimal mais explicable par la concentration des acides nucléiques dans l'échantillon. En effet, nos échantillons contenant très peu d'ARN, la valeur de l'absorbance à 260nm est faible tandis que celle à 230nm reste relativement stable (parce qu'on a utilisé pendant l'extraction les mêmes quantités de composés contaminants par rapport à une extraction classique). En conséquence, le rapport A₂₆₀/A₂₃₀ est faible.

5.2 Vérification de l'intégrité des ARN

Les profils des résultats obtenus sont reportés dans la figure 18 ci-dessous.

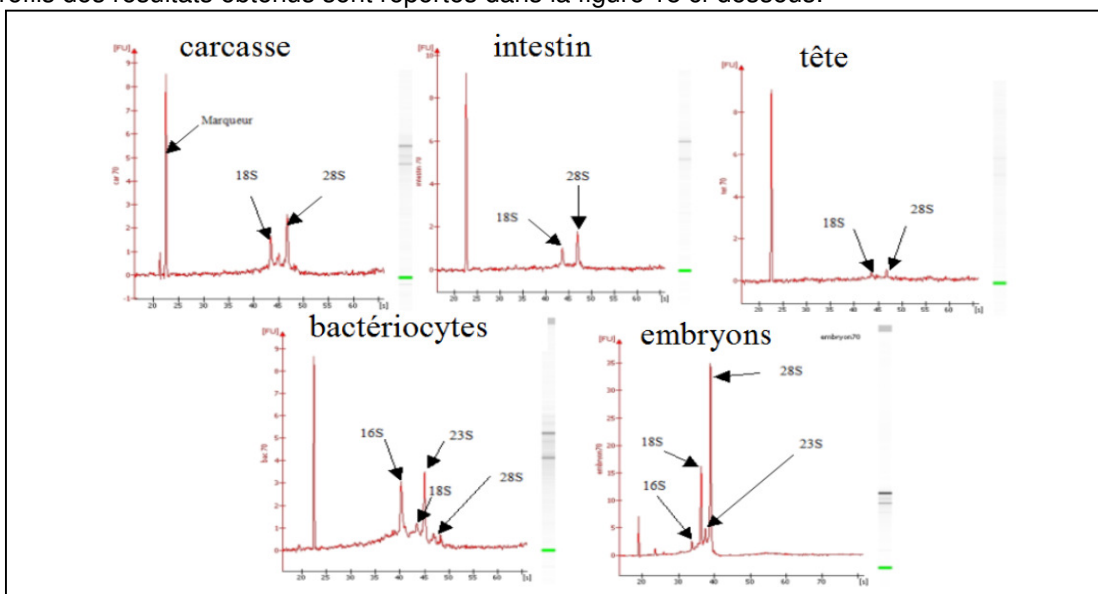


Figure 18 : Tracés obtenus lors de l'analyse des ARN extraits par le bioanalyseur Agilent 2100.

Les ARNr 18 et 28S sont retrouvés dans les compartiments tissulaires eucaryotes, tandis que les ARNr 16 et 23S sont détectables dans le matériel procaryote.

On peut tout d'abord noter la présence d'ARN 16S et 23S d'origine bactérienne exclusivement dans les bactériocytes et les embryons (les seuls compartiments du puceron à contenir *Buchnera*). Il y a aussi plus d'ARN procaryotes dans les bactériocytes que dans les embryons (pics plus haut), ce qui est tout à fait normal puisque les bactériocytes sont très majoritairement procaryotes. Les profils sont acceptables pour la suite des manipulations d'après les profils de références donnés dans la figure 11 (cf p12).

5.3 RT-PCR

Il a fallu tout d'abord tester les amorces sur de l'ADNg de puceron afin de trouver la température d'hybridation optimale d'une paire d'amorces au cours de l'étape 2 d'un cycle de PCR. De même, lorsque nous n'obtenions pas de résultats convaincants, il fallait tester de nouvelles amorces pour un gène en les combinant avec les anciennes. Pour cela, des associations du type R1/F1 ; R2/F2 : R1/F2 et R2/F1 ont été réalisées pour 7 gènes. Enfin, lorsque les températures ont été fixées pour chaque gène et les combinaisons d'amorces optimisées, il a été possible de réaliser la recherche des gènes actifs pour chaque compartiment du puceron grâce à l'ADNc synthétisé.

Le tableau 6 représente les combinaisons d'amorces retenues pour chaque gène ainsi que leur température d'hybridation utilisée pour la PCR sur l'ADNc des 5 tissus.

Tableau 6 : Couples d'amorces et températures d'hybridation (Ta) retenus pour les différents gènes sélectionnés.

gènes	combinaisons amorces	Ta optimale (°C)
<i>ANT2</i>	ANT2_R1 / ANT2_F1	48
<i>Calréticuline</i>	calr_R1 / calr_F1	48
<i>Henna</i>	henna_R1 / henna_F1	55
<i>Cathepsine</i>	cath_R2 / cath_F1	58
<i>Aquaporine-4</i>	aqp_R2 / aqp_F2	50
<i>Cystathionine γ-lyase</i>	cyst_R2 / cyst_F2	50
<i>VacATPase</i>	vacATP_R1 / vacATP_F1	55
<i>Mitochondrial Carrier</i>	MC_R2 / MC_F1	58
<i>AGAP</i>	AGAP_R1 / AGAP_F1	48
<i>GAPDH</i>	glyc_R2 / glyc_F2	50
<i>oGS2</i>	oGS2_R2 / oGS2_F2	58
<i>cGS2</i>	cGS2_R2 / cGS2_F1	58

Pour chaque gène et chaque compartiment tissulaire, les réactions de RT-PCR ont été menées à la fois sur des échantillons dits (RT-) et (RT+). Les (RT-) ont subi la réaction de rétrotranscription sans l'enzyme, l'absence d'ADN dans les échantillons d'ARN est ainsi vérifiée (aucune bande visible sur le gel). Les échantillons (RT+) représentent les ARN rétrotranscrits (ADNc) où cette fois-ci l'enzyme est utilisée. Un témoin positif (ADNg) ainsi qu'un autre témoin négatif (eau) ont également été réalisés pour chaque gène pour vérifier d'une part la présence du gène dans le génome du puceron et, d'autre part, l'absence de contamination par de l'ADN pendant la manipulation.

La figure 19 montre un exemple de photographie de gel obtenu lors de la recherche de l'expression du gène *VacATPase* dans la carcasse, la tête, le tube digestif, les bactériocytes et les embryons.

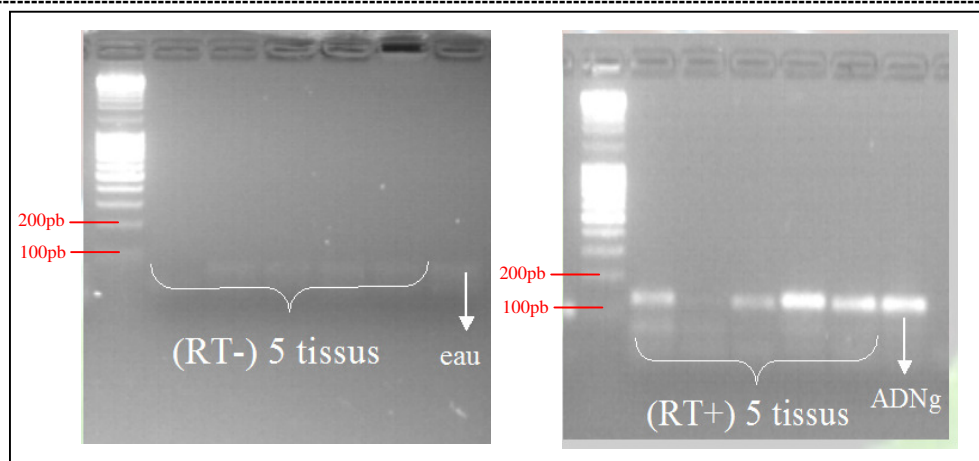


Figure 19 : Résultats obtenus lors de la RT-PCR sur le gène *VacATPase*.

Cinq RT- (pas de rétrotranscription faite sur les 5 compartiments, dans l'ordre : carcasse, tête, tube digestif, bactériocytes et embryons) et cinq RT+ correspondant aux cinq compartiments tissulaires étudiés (dans le même ordre) où les rétrotranscriptions ont été effectuées sont réalisées. Un témoin négatif (eau) et un témoin positif (ADNg) sont également opérés afin de vérifier d'une part la non contamination des réactifs de PCR par de l'ADN et d'autre part la confirmation de la présence du gène dans le génome du puceron et le fonctionnement des amorces et autres réactifs de PCR.

Les résultats finaux de la RT-PCR regroupant tous les gènes et tous les compartiments sont reportés dans la figure 20. Seuls les signaux obtenus sur l'ADNc (dans chaque compartiment) et l'ADNg sont représentés.

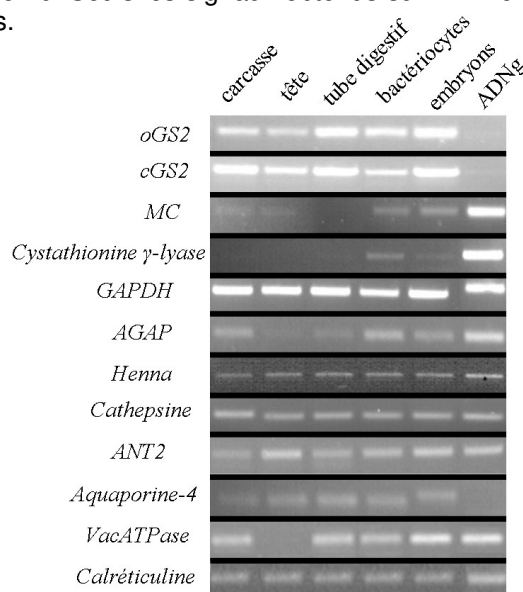


Figure 20 : Résultats obtenus lors de la recherche des gènes actifs dans les différentes parties du puceron disséqué.

Les 5 organes sont représentés en haut avec le témoin positif (ADNg), les gènes étant sur la gauche.

On peut tout de suite remarquer que l'intensité des signaux varie d'un gène à un autre et d'un compartiment à l'autre. Par exemple, le gène codant la protéine GAPDH est largement exprimé dans les 5 parties du puceron alors que le gène codant la protéine cystathionine gamma-lyase est principalement exprimé dans les bactériocytes.

On peut également noter qu'il n'y a pas de signal pour les gènes codant la *GS2* et l'*Aquaporine-4* en ce qui concerne les témoins positifs. Pour *GS2*, un signal avec l'ADNg a été obtenu mais il a migré moins loin : les fragments amplifiés avec l'ADNg ont une taille bien supérieure à celles obtenues avec l'ADNc. Pour tenter d'expliquer ces résultats, les produits de PCR ont été envoyés au séquençage (non effectué au laboratoire). Les résultats ont montré que cette différence de taille est explicable par la présence d'un intron d'environ 830 pb dans la séquence génomique. Cet intron n'était pas reporté dans les bases de données utilisées, à cause d'un probable problème d'annotation. Cet intron, probablement éliminé de l'ARN par le phénomène

d'épissage, justifie la différence de taille des amplifications obtenues sur l'ADNc comparativement à celles obtenues avec l'ADNg. En ce qui concerne le gène de l'aquaporine, le témoin positif n'est pas visible sur la figure mais il l'était sur le gel observé sous UV.

5.4 qRT-PCR

Dans les figures 21, 22 et 23, j'ai reporté respectivement pour les trois gènes testés : les droites étalons, les courbes d'amplification et de fusion obtenues lors de la réalisation de la RT-PCR quantitative.

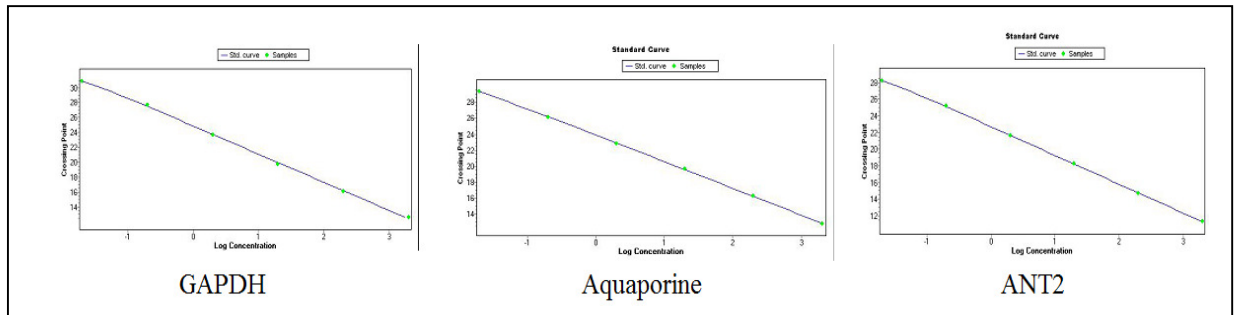


Figure 21 : Etalonnages pour les 3 gènes testés en qRT-PCR

La fluorescence est mesurée pour les 6 dilutions au cours des cycles de PCR, les points obtenus forment la droite d'étalonnage pour chaque gène.

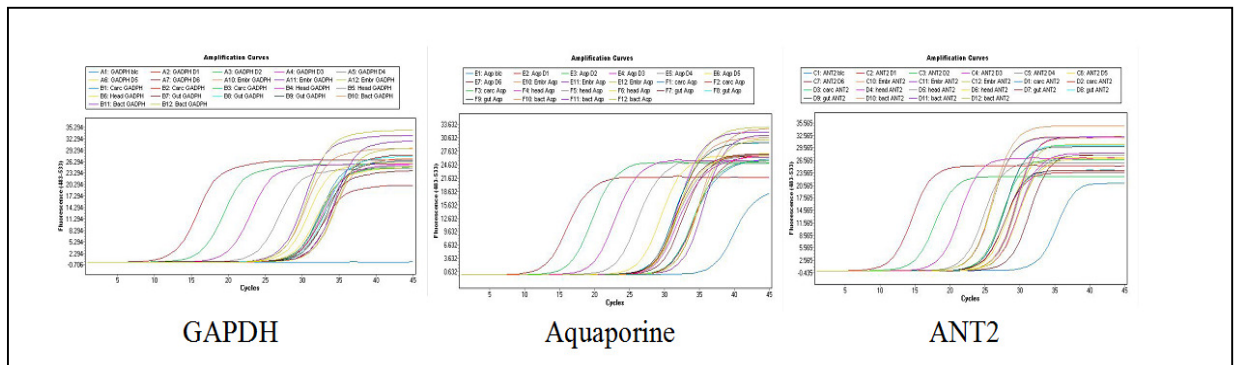


Figure 22 : Courbes d'amplifications obtenues

Un échantillon moins concentré sera détecté plus tard qu'un autre plus concentré. Dans ces résultats, les échantillons sortent tard (vers la 6^e dilution), ce qui montre de faibles quantités d'acides nucléiques obtenues.

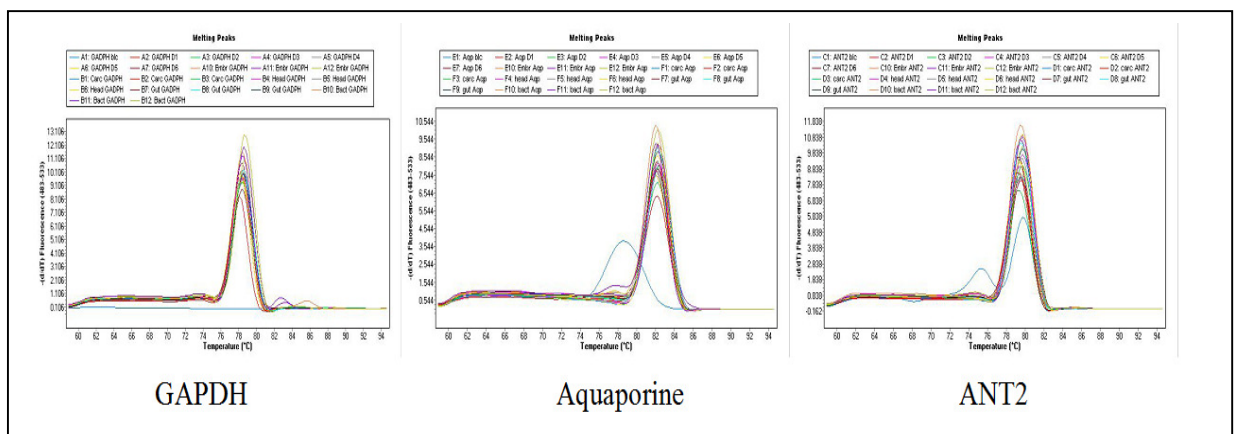


Figure 23 : Courbes de fusion des produits de qRT-PCR obtenues.

A la fin des cycles de PCR, la température augmente graduellement pour dénaturer les amplicons. Une température unique de dénaturation assure que la RT-PCR quantitative a été spécifique.

En ce qui concerne les droites d'étalonnage, les résultats sont cohérents (la fluorescence décroît avec la dilution). On peut aussi remarquer sur les courbes d'amplification les sorties des dilutions D1 à D6 dans cet ordre : la fluorescence est tout d'abord détectée dans l'échantillon le plus

concentré, ce qui est normal. Pour les 3 gènes, les courbes d'amplification se situent autour de la courbe obtenue pour la dilution 6 : les quantités d'acides nucléiques sont très faibles.

A propos des courbes de fusion, elles correspondent à l'élévation de la température de degré en degré à la fin des 45 cycles. Si les produits de PCR sont spécifiques, alors la température de dénaturation des amplicons est identique pour tous. Dans un cas contraire, où des produits non spécifiques seraient obtenus, la température de dénaturation sera différente de celle des produits PCR spécifiques et on n'observera alors pas un seul pic. D'après les résultats, on peut remarquer que pour *GAPDH*, la température de dénaturation des amplicons est unique (environ 78°C) tandis que pour *ANT2* et *Aquaporine-4*, on peut observer une courbe anormale pour les blancs : les amorces se sont dimérisées pour former une structure de type ADN double brin qui est dénaturée prématurément par rapport au produit de PCR.

La figure 24 ci dessous représente les ratios d'expressions obtenus par analyse REST pour chacun des compartiments embryons, carcasse, tube digestif et tête pour les deux gènes *ANT2* et *Aquaporine-4* (*Aqp*) suite à la normalisation par rapport au gène *GAPDH* et au tissu de référence : les bactériocytes.

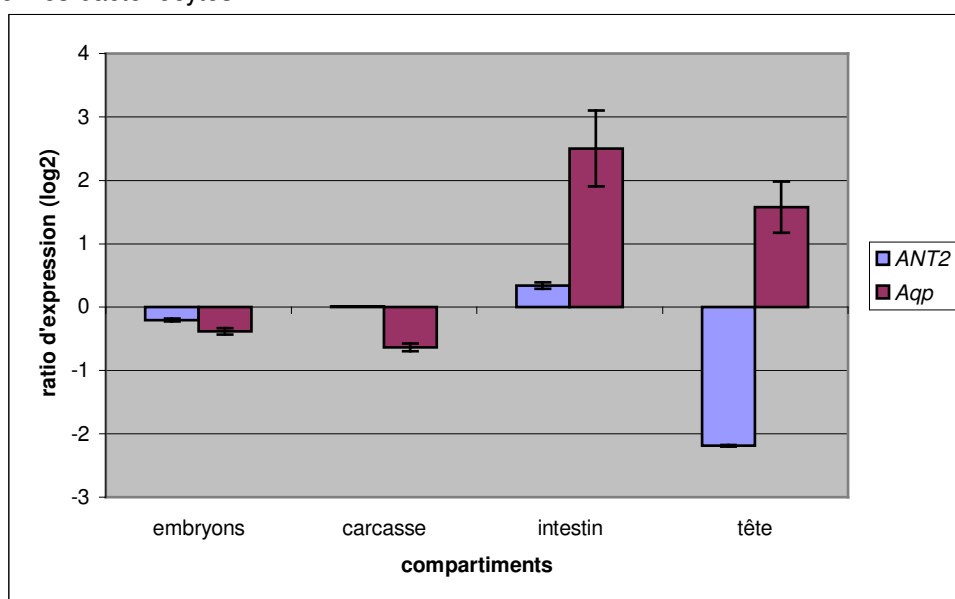


Figure 24 : Expression relative, comparativement au gène de normalisation *GAPDH*, des gènes *ANT2* et *aquaporine* dans les tissus du puceron.

Analyse effectuée grâce au logiciel *REST*. Les ratios d'expression négatifs indiquent une sous-expression du gène dans le compartiment testé par rapport à la référence. Inversement, les ratios positifs indiquent une sur-expression du gène.

La limite de significativité biologique pour ce type d'analyses est placée par de nombreux auteurs respectivement à +1 si on veut considérer un gène comme étant sur-exprimé et à -1 si on veut considérer un gène comme étant sous-exprimé. Ainsi, On peut remarquer qu'on n'observe pas de différence significative entre les embryons et la carcasse par rapport aux bactériocytes. En ce qui concerne le gène de l'*Aquaporine-4*, le ratio d'expression est significativement plus élevé dans l'intestin et la tête par rapport aux autres tissus (concordance avec les travaux de Shakesby *et al.*). Enfin, on peut noter que le gène *ANT2* est significativement sous-exprimé dans la tête par rapport aux autres compartiments.

Biologiquement, ces résultats ont un sens. En effet, les embryons et la carcasse sont des compartiments représentatifs du puceron entier : les embryons sont des individus complets tandis que la carcasse, qui « emballe » le puceron, peut contenir des traces de tous les tissus de l'organisme. Il n'est donc pas anormal de ne pas trouver de gènes différenciellement exprimés entre les embryons et la carcasse. L'intestin ainsi que la tête sont des compartiments spécialisés : ils sont donc beaucoup plus caractérisés par une expression tête ou intestin-spécifique comme c'est le cas pour les gènes *ANT2* et *Aquaporine-4*.

6. Conclusions, perspectives et bilan personnel

Mon étude montre tout d'abord que la caractérisation des ARN par RT-PCR et RT-PCR en temps réel à partir d'un seul puceron est possible. L'analyse des profils d'expression des gènes sélectionnés a pu être réalisée à partir de petites quantités d'ARN dans chaque compartiment, ce qui nous permet d'envisager la possibilité de contrôler l'inactivation d'un gène dans 5 différents tissus du puceron, pour évaluer la tissu-spécificité d'extinction des gènes d'intérêt lors d'expériences d'inactivation fonctionnelles type RNAi. Enfin, d'un point plus technique, j'ai pu tester les conditions de réalisation de la PCR en temps réel, ce qui m'a permis de définir l'étendue des dilutions à réaliser. Pour les futures qPCR, des gammes étalon plus étendues et basées sur des gammes de concentration moins importantes seront réalisées, afin de pouvoir bien être en accord avec la concentration de nos échantillons. Celles-ci seront essentielles pour pouvoir mesurer l'extinction des gènes par la stratégie RNAi définie.

La mise au point des conditions expérimentales optimales pour les expériences de RNAi est actuellement en cours de développement par l'équipe *Symtrophique*. A partir d'ADNg de puceron, le gène à inactiver est amplifié par PCR puis un kit spécial permet d'obtenir à partir des produits de PCR de l'ARN double brin spécifique à ce gène. Cette dernière molécule joue le rôle de l'ARN interférent, capable de s'hybrider aux ARNm produits par le gène et de conduire à la dégradation de ceux-ci. L'introduction de la molécule active dans le puceron sera effectuée selon deux techniques (injection et prise alimentaire sur milieu artificiel) afin de les comparer et d'estimer la puissance de l'interférence ARN dans la perspective de neutraliser des gènes essentiels à la survie de l'insecte.

Ce stage au sein du laboratoire de l'UMR BF2I de Lyon m'a été bénéfique et enrichissant dans la mesure où il m'a permis de connaître plus précisément comment les techniques de biologie moléculaire représentent un moyen de plus en plus exploré dans la lutte contre les ravageurs des cultures. Il m'a également permis de contribuer à la réalisation d'un projet tout en travaillant avec tous les acteurs d'une équipe de recherche : les étudiants en thèse, le personnel technique et les chercheurs.

Je me rends désormais mieux compte de la nécessité d'adaptation de protocoles en fonction du travail demandé. L'étude à l'échelle des tissus d'un seul puceron n'avait encore jamais été entreprise dans l'équipe ou par d'autres chercheurs travaillant sur ce modèle expérimental. Ainsi, j'ai dû adapter les protocoles d'extraction des ARN et de rétrotranscription au matériel biologique dont je disposais. J'ai aussi réellement pris conscience des fonds nécessaires à la réalisation de travaux en laboratoire de recherche où les sommes deviennent vite importantes. Par ailleurs, mon implication dans ce projet m'a permis de me sentir responsable et notamment dans les résultats obtenus qui vont être utilisés pour la poursuite du projet.

Finaliser la formation de 2 ans à l'IUT par ce stage de longue durée a réellement été bénéfique pour ma formation tant professionnelle que personnelle. En effet, étant très intéressé par la recherche et la réalisation de projets scientifiques en relation avec l'agronomie, le travail effectué au laboratoire concordait tout à fait avec mes intérêts. J'ai également pu acquérir beaucoup d'autonomie et de confiance en moi quant à la réalisation pratique d'un travail expérimental, qualités qui semblent fortement appréciées dans le monde professionnel. Je remercie une dernière fois toute l'équipe d'accueil pour cet enrichissement scientifique auquel j'accorde une place prépondérante au cours de ma formation universitaire.

7. Références bibliographiques

Revues, Ouvrages, Publications :

- ACTA (1982), *Les pucerons des cultures*, édition Le Carrousel.
- Baum *et al.*, (2007), *Control of coleopteran insect pests through RNA interference*, Nat Biotechnol, 25(11):1322-6.
- Baumann *et al.* (1995), *Genetics, physiology and evolutionary relationships of the genus Buchnera: Intracellular symbionts of aphids*. Annu Rev Microbiol, 49: 55-94.
- Baumann (2005), *Biology of bacteriocyte-associated endosymbionts of plant sap-sucking insects*, Annu Rev Microbiol, 59: 155-189.
- Buchner (1965), *Symbiosis in animals which suck plant juices*. In : Endosymbiosis of Animals with Plant Microorganisms. Ed. New York, Intersciences, 210-432.
- Dedryver (2007) *Pucerons : des dégâts et des hommes*, In : Biofutur, 279, 22-25.
- Douglas *et al.* (2003), *The nutritional physiology of aphids*. Adv Insect Physiol 31: 73-140.
- Febvay *et al.* (1995), *Analysis of energetic amino acid metabolism in Acyrthosiphon pisum: a multidimensional approach to amino acid metabolism in aphids*. Arch Insect Biochem Physiol 29: 45-69.
- Febvay *et al.* (1999), *Fate of dietary sucrose and neosynthesis of amino acids in the pea aphid, Acyrthosiphon pisum, reared on different diets*. J Exp Biol, 202: 2639-2652.
- Geneci *et al.* (2007), *Aphid species of the Central Aksaray*. International Journal of Natural and Engineering Sciences, 1:19-21.
- Herbeck *et al.* (2005), *Nonhomogeneous model of sequence evolution indicates independent origins of primary endosymbionts within the enterobacteriales (gamma-Proteobacteria)*. Mol Biol Evol. ; 22(3) : 520-32.
- Jaubert-Possamai *et al.* (2007), *Gene knockdown by RNAi in the pea aphid Acyrthosiphon pisum*. BMC Biotechnol 7: 63.
- Miura *et al.*, (2003), *A comparison of parthenogenetic and sexual embryogenesis of the pea aphid Acyrthosiphon pisum (Hemiptera: Aphidoidea)* J Exp Zool B Mol Dev Evol. 15;295(1):59-81.
- Moran & Degnan (2006), *Functional genomics of Buchnera and the ecology of aphid hosts*. Mol Ecol, 15: 1251-1261.
- Pfaffl *et al.* (2002), *Relative expression software tool (REST) for group-wise comparison and statistical analysis of relative expression results in real-time PCR*, Nucleic Acids Res., 30, 9e36, 1-10.
- Schwartzberg *et al.* (2008), *Juvenile hormone titres and winged offspring production do not correlate in the pea aphid, Acyrthosiphon pisum*, J Insect Physiol. ; 54(9):1332-6.
- Shakesby *et al.* (2008), *A water-specific aquaporin involved in aphid osmoregulation*, Insect Biochemistry and Molecular Biology 39(1):1-10.
- Shigenobu *et al.* (2000), *Genome sequence of the endocellular bacterial symbiont of aphids Buchnera sp. APS*, Nature ; 407(6800):81-6
- Wilkinson *et al.* (1998), *Host cell allometry and regulation of the symbiosis between pea aphids, Acyrthosiphon pisum, and bacteria, Buchnera*. J Insect Physiol. ; 44(7-8):629-635.
- Wilkinson *et al.* (2003), *Transmission of symbiotic bacteria Buchnera to parthenogenetic embryos in the aphid Acyrthosiphon pisum (Hemiptera : Aphidoidea)*. Arthropod Struct. Dev., 32:241-245.
- Zientz *et al.*, (2001), *Genome interdependence in insect-bacterium symbioses*. Genome Biol., 2:321-326.

Sites Internet :

- <http://fr.wikipedia.org/wiki/Puceron>
- <http://images.google.fr/>
- <http://www.gov.mb.ca/agriculture/crops/insects/fad14s00.html>
- <http://www.inra.fr>
- <http://www.inra.fr/hyppz/>
- <http://www.insa-lyon.fr/bf2i/>
- <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/>

Annexes

Annexe 1

➤ Tampon A de dissection

- KCl [0,025M] (wt 74,5) : 0,93g
- MgCl₂ [0,01M] (wt 203,3) : 1,01g
- Sacharose [0,25M] (wt 342,3) : 42,8g
- Tris/HCl [0,035M] (wt 157,6) : 2,11g

->qsp 500mL H₂O pH 7,5 et autoclavage 110°C pendant 15 minutes. Cette solution est stockée à +4°C.

Annexe 2

➤ Protocole détaillé de l'extraction des ARN totaux

Extraction d'ARN

de tissus digestifs et autres tissus isolés de puceron

Kit : RNeasy Mini Protocol for RNA Cleanup (Qiagen)

Cette purification permet d'extraire l'ARN et de détruire l'ADN génomique éventuellement contaminant sans utilisation de solvants organiques qui pourraient gêner la réaction de marquage. Pour des petites quantités de matériel biologique, il n'est pas nécessaire de réaliser une Dnase (pag. 58 protocole Qiagen)

N.B. Toutes les étapes doivent étre exécutés à température ambiante et assez rapidement.

Purification sur colonne : (à partir de 20 tubes digestifs ou (400) bactériocytes issus de dissection manuelle, conserves à -80°C)

sous la hotte chimique :

Préparer le tampon en ajoutant 10 µl de β-Mercaptoéthanol à 1 ml de tampon RLT (*sous hotte chimique, à cause du β-Mercaptoéthanol, jusqu'à l'ajout du tampon RPE*).

Ajouter à l'échantillon **350 µl de tampon RLT** ainsi préparé.

Homogénéiser à l'aide d'un **appareil électrique** à homogénéiser

Mélanger au vortex quelques secondes.

Incuber la solution à T°C ambiante pendant 5 min.

Ajouter 250 µl d'éthanol (96-100 %) à température ambiante et mélanger à l'aide de la pipette. (mais ne pas centrifuger)

Transférer les échantillons (environ 600µL) sur une colonne avec son tube de collection,

Centrifuger 15 secondes à 13000 rpm (*Attention, il est important de déclencher le chronomètre au moment où la centrifugeuse atteint 13000 rpm*).

Jeter le liquide et re-positionner la colonne sur le tube de collection.

Ajouter 700 µl de tampon RW1. Fermer le tube très doucement et **centrifuger 15 secondes à 13000 rpm**.

Transférer la colonne dans un **nouveau tube de collection**.

Ajouter 500 µl de tampon RPE (préparé auparavant comme solution concentrée 1 : 4 avec de l'EtOH 100 %) et centrifuger 15 secondes à 13000 rpm pour laver la colonne.

Jeter la solution contenant les contaminants.

Ajouter 500 µl de tampon RPE

Centrifuger 2 min à 13000 rpm

Placer la colonne dans un **nouveau tube de collection**

Centrifuger à vide à **13000 rpm pendant 1 min**.

Transférer la colonne dans un **tube propre** et éluer avec **30 µl d'eau RF** (fournie par le kit).

Centrifuger **1 min à 13000 rpm**.

Repasser les 30 µl sur la colonne et centrifuger 1 min à 13000 rpm.

Quantifier l'ARN ainsi purifié au spectrophotomètre (Nanodrop).

Stocker à - 80 °C.

Annexe 3

➤ Orange G

Dissoudre 20g de saccharose dans 40mL d'eau, ajouter 15g de glycérol et dissoudre 100mg d'orange G dans cette solution. Compléter jusqu'à 50mL avec de l'eau. Autoclaver à 110°C pendant 15min. Cette solution est stockée à +4°C.

Annexe 4

➤ Protocole détaillé pour la préparation de la plaque 96 puits pour qRT-PCR

1. Préparation de la gamme étalon

Remarque : utiliser de préférence des cônes avec filtres et allonger la pipette 10µl pour que le bord de la pipette ne touche pas le bord des tubes Eppendorf (pbm de contaminations)

- Ajuster les produits PCR (purifiés sur colonne et obtenus sur ADNg) à 20 ng/µl avec de l'eau UP autoclavée. Calculer à partir du volume réel restant à mesurer à la pipette, et non à partir du vol théorique restant. Solution à conserver à -20°C
- A partir de la solution de produit de PCR à 20ng/µl, réaliser les dilutions suivantes en cascade (vortexer et centrifuger une solution avant de récupérer le volume nécessaire pour la dilution suivante):

SM	2 ng/µl	5 µl de solution à 20 ng/µl dans 45 µl d'eau UP autoclavée
A	0,2 ng/µl	5µl de solution SM dans 45 µl d'eau UP autoclavée
B	0,02 ng/µl	5µl de solution A dans 45 µl d'eau UP autoclavée
D1	2000 fg/µl	5 µl de solution B dans 45 µl d'eau UP autoclavée
D2	200 fg/µl	5 µl de solution D1 dans 45 µl d'eau UP autoclavée
D3	20 fg/µl	5 µl de solution D2 dans 45 µl d'eau UP autoclavée
D4	2 fg/µl	5 µl de solution D3 dans 45 µl d'eau UP autoclavée
D5	0,2 fg/µl	5 µl de solution D4 dans 45 µl d'eau UP autoclavée
D6	0,02 fg/µl	5 µl de solution D5 dans 45 µl d'eau UP autoclavée

La gamme étalon proprement dite sera composée des dilutions D1 à D6.

Garder les solutions diluées dans la glace jusqu'à leur utilisation.

2. Préparation du MIX

- Primers : à partir des solutions mères 1mM, préparer une dilution 1/100 en mettant 1µl dans 99 µl d'eau UP autoclavée : cette dilution à 10µM servira pour le MIX. Elle doit être préparée extemporanément, on n'utilisera pas les dilutions conservées à -20°C pour cette manip, mais des dilutions fraîches.

- Préparer un MIX par gène (= par couple de primers) Vol (pour 1)

Water PCR-grade (eau du Kit ou eau UP autoclavée maison)	1,5µl
Primer 10µM	0,5µl + 0,5 µl
Master MIX (2X)	5 µl

Répartir : 7,5 µl par puits

Mettre à l'abri de la lumière (papier alu) et conserver dans la glace.

3. Dilution et répartition des RT (les dilutions des produits de RT peuvent être préparées les jours précédents l'expérience)

- Compter 0,5 µl de RT pure par réaction (puits) et faire une **dilution au 1/5°** avec de l'eau UP autoclavée.
- Répartir 2,5 µl de RT diluées (si vol final 10µl) en suivant le plan de plaque.

Les RT peuvent être décongelées au moment de l'ajout dans la plaque

4. Répartition des réactifs dans la plaque

Ajouter dans l'ordre, sur une plaque maintenue sur de la glace et séparée de celle-ci par deux couches de papier alu :

- Le mix de PCR (7,5 µl par puits, vortexer et centrifuger la solution avant de la répartir).
- Les dilutions pour la gamme étalon (2,5 µl par puits, vortexer et centrifuger chaque dilution).
- Les RT (2,5 µl par puits, centrifuger -mais pas vortexer- et bien pipeter avant la répartition). Pipeter également après l'ajout des RT dans les puits correspondants.
- L'eau dans les puits du blanc (2,5 µl par puits).

Filmer la plaque en appliquant le film autocollant **attention : ne jamais toucher le film avec les mains**, l'appliquer avec le rebord d'une boîte à cône.

La plaque peut ainsi être conservée 24h à 4°C à l'abri de la lumière (ne pas congeler).

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

Résumé

La relation symbiotique entre les pucerons et *Buchnera aphidicola* est l'un des modèles de symbiose le plus étudié à un niveau biologique. Cette symbiose est basée sur l'association entre un organisme eucaryote connu comme un important ravageur des cultures en zone tempérée, le puceron, et un organisme procaryote proche d'*Escherichia coli*, la bactérie *Buchnera*. Cette bactérie symbiotique fournit au puceron les acides aminés essentiels qu'il n'est pas capable de synthétiser et, d'autre part, le puceron fournit à *Buchnera* les acides aminés non essentiels prélevés dans la sève phloémienne des plantes, dont les voies de biosynthèse ont été perdues chez la bactérie. L'une des thématiques de l'UMR INRA-INSA de Lyon BF2I (Biologie Fonctionnelle, Insectes et Interactions), dans laquelle j'ai réalisé mon stage, est l'analyse aux niveaux fonctionnel et évolutif des interactions trophiques dans la symbiose entre *Buchnera* et le puceron du pois.

Dans le cadre de mon travail au sein de l'UMR, j'ai cherché à caractériser l'expression de gènes intervenant essentiellement dans le métabolisme et les échanges d'acides aminés entre les deux partenaires associés. Ce projet a pu être réalisé grâce à la technique de RT-PCR dont le principe repose sur la détection de séquences nucléotidiques spécifiques à partir d'ARNm rétrotranscrits. Il était de grand intérêt pour l'équipe d'accueil d'appliquer cette technique, déjà largement utilisée au laboratoire pour la détection de l'expression de gènes dans des insectes entiers, à l'étude séparée de 5 compartiments du puceron : sa tête, son tube digestif, ses embryons, ses bactériocytes (cellules spécialisées hébergeant les bactéries symbiotiques) et sa carcasse. Pour cela, j'ai pris en charge l'adaptation de toutes les étapes nécessaires à la détection des transcrits par RT-PCR à l'analyse dans des tissus microscopiques comme peuvent l'être ceux des insectes. Après avoir sélectionné, à l'aide du logiciel *Oligo 6.8*, des amorces spécifiques aux gènes d'intérêt, j'ai testé ces amorces sur de l'ADNg de puceron afin de déterminer les conditions optimales de PCR. Après dissection de l'insecte, j'ai adapté le protocole d'extraction d'ARN totaux aux 5 tissus du puceron. Ce matériel biologique a ensuite été quantifié par spectrophotométrie puis sa qualité estimée grâce à une électrophorèse capillaire. Un kit pour rétrotranscription a ensuite été utilisé pour passer de l'ARNm à l'ADNc et ce dernier a été utilisé comme matrice pour la réaction de PCR. Dans un deuxième temps, j'ai utilisé la technique de PCR en temps réel afin de comparer l'expression de certains gènes entre eux. Cette technique de biologie moléculaire est très sensible et permet de révéler une très faible expression d'un gène donné alors que les résultats de la RT-PCR pour ce même gène peuvent conduire à conclure à sa non-expression. Ces analyses m'ont permis d'obtenir une cartographie des gènes d'intérêt dans les différents compartiments corporels de l'insecte, étape préalable à la mise au point d'une stratégie d'inactivation de ces mêmes gènes par la technique de l'interférence par l'ARN (communément appelé RNAi), actuellement en cours de développement dans l'UMR BF2I.