

UNITE D'ENTOMOLOGIE FONCTIONNELLE ET EVOLUTIVE DE GEMBLOUX
(BELGIQUE)

Etude du rôle des bactéries symbiotiques de pucerons dans l'adaptation aux plantes hôtes.

Mémoire de fin d'études

Année académique : 2006-2007

Promoteurs :

Dr. Frédéric FRANCIS

Pr. Eric HAUBRUGE

Présenté par :

YATTARA Almouner Ag Alhamis

En vue de l'obtention du Diplôme de Master
Complémentaire International en
Protection des Cultures Tropicales et
Subtropicales

© « Toute reproduction du présent document, par quelque procédé que ce soit, ne peut être réalisé qu'avec l'autorisation de l'auteur et de l'autorité académique de la Faculté Universitaire des Sciences Agronomiques de Gembloux. »

Le présent document n'engage que son auteur

Remerciements

Je tiens tout d'abord, à remercier le Dr. Frédéric FRANCIS, premier assistant de l'unité d'Entomologie Fonctionnelle et Evolutive de la Faculté des Sciences Agronomiques de Gembloux, pour avoir accepter que ce travail soit mené et en être le promoteur. Son esprit, sa rigueur scientifique et surtout l'intérêt qu'il a accordé à ce sujet m'ont permis de réaliser ce travail. Je ne saurais assez vous remercier pour tout ce que j'ai appris grâce à votre encadrement sans faille. Veuillez accepter ma profonde estime et ma grande reconnaissance.

Je voudrais aussi adresser mes plus vifs remerciements au Pr. Eric HAUBRUGE, responsable de l'unité d'entomologie Fonctionnelle et Evolutive de la Faculté des Sciences Agronomiques de Gembloux, Co-promoteur de ce travail, qui a accepter m'accueillir au sein de son service

Mes remerciements s'adressent aussi à tout le personnel technique et administratif du laboratoire, aux assistants de l'unité d'entomologie Fonctionnelle et Evolutive de la Faculté des Sciences Agronomiques de Gembloux, qui par leur aide directe ou indirecte ont permis mon intégration et la réalisation de ce travail. Un merci particulier à Messieurs Nicolas HARMEL et Taofic A. F. ALABI qui n'ont ménagé aucun effort pour m'accorder leur service à mes nombreuses sollicitations.

Je tiens enfin à remercier tous ceux qui, de près ou de loin, ont contribué directement ou indirectement à la réalisation de ce document.

Almouner Ag A. Yattara (2007) : Etude du rôle des bactéries symbiotiques de pucerons dans l'adaptation aux plantes hôtes.

Résumé :

Les résultats de notre travail indiquent une réduction très significative du nombre d'adultes survivants et de nymphes des deux espèces de pucerons (*M. persicae* et *A. pisum*), quand ceux-ci sont élevés sur la diète artificielle contenant de la chlortétracycline ou de la rifampicine comme antibiotiques. Le nombre d'adultes survivants ou de nymphes varient en fonction des doses de chlortétracycline et de la rifampicine. Le développement et la reproduction de *Myzus persicae* décroît, avec l'augmentation des doses. La plus forte mortalité des pucerons est enregistrée aux doses de 100 et 200 µg/ml, pour les deux espèces de pucerons. Ainsi, les pucerons élevés sur les doses 50, 100 et 200 µg /ml ont enregistré la plus faible moyenne de nymphes émergeant, par rapport aux doses de 10 ; 25 µg/ml, quand ceux sont élevés sur la diète artificielle contenant soit de la chlortétracycline, soit de la rifampicine. Les concentrations d'ampicilline utilisées ne semblent pas avoir d'effet significatif sur la survie de *M. persicae* et *d'A. pisum*, même si des différences hautement significatives sur la fécondité des pucerons ont été révélées.

Les adultes de *M. persicae* nourris à la rifampicine présentent statistiquement les mêmes effets que ceux nourris à la chlortétracycline après leur transfert sur *Vicia faba* et *Arabidopsis thaliana*. Quant aux nombre de nymphes produits par cette espèce, des différences très significatives ont été enregistrées entre les antibiotiques. L'espèce *A. pisum* est incapable de survivre sur *Arabidopsis thaliana*.

Des différences significatives de composition du protéome des bactéries symbiotiques issues des deux espèces de pucerons sont donc visualisées. Suite à l'analyse des gels, de 190 à 232 spots ont été identifiés sur les gels en fonction du traitement considéré. Lors de la comparaison des protéines aphidiennes issues de l'alimentation des pucerons sur diètes avec des antibiotiques, vingt huit spots ont été identifiés comme variant d'un facteur 2,08 à 11,99 (ratio de valeurs de %Volume) en considérant le traitement à la chlortétracycline d'*A. pisum*. Vingt et un spots se sont révélés varier d'un facteur 2,00 à 9,11 lors de la comparaison des protéines du puceron du pois nourris sur diète témoin et de ceux alimentés avec la rifampicine

Mots clés : symbiose, bactéries, pucerons, protéomique.

Almouner Ag A. Yattara (2007) : Study of the role of symbiotic bacterial of aphids in the adaptation to host plants.

Abstract :

The results of our work indicate a very significant reduction of the number of surviving adults and nymphs of the two species of aphids (*M. persicae* and *A. pisum*), when dose are high on the artificial diet containing of the chlortetracyclin or the rifampicin like antibiotics. The number of surviving adults or nymphs varies according to the dose of chlortetracyclin and the rifampicin. The development and reproduction of *Myzus persicae* decrease, with the increase dose. The strongest mortality of the plant aphids is recorded with the dose of 100 and 200 µg/ml, for the two species of aphids. Thus, aphids raised on dose 50, 100 and 200 µg /ml recorded the weakest average of nymphs emerging, compared to the concentration of 10; 25 µg/ml, when dose are high on the artificial diet container either of the chlortetracyclin, or of the rifampicin. The ampicillin concentrations used do not seem to have of significant effect on survival of *M. persicae* and *A. pisum*, even if highly significant differences on fruitfulness of. The aphids were revealed

The adults of *M. persicae* nourished with the rifampicin present the same effects statistically as those nourished with the chlortetracyclin after their transfer on *Vicia faba* and *Arabidopsis thaliana*. As for the number of nymphs produced by this species, of the very significant differences were recorded between antibiotics. Species *A. pisum* is unable to survive on *Arabidopsis thaliana*.

Significant differences in composition of the proteome of the symbiotic bacteria resulting from the two species of plant louses are thus visualized. following the analysis of the gel, from 190 to 232 spots were identified on the gel according to the treatment considered. At the time of the comparison of the proteins aphids resulting from the food from the aphids on diets with antibiotics, twenty eight spots were identified like variable of a factor 2,08 to 11,99 (ratio of values of % Volume) by considering the treatment the chlortetracycline *A. pisum*. Twenties and one spots proved to vary from a factor 2,00 to 9,11 at the time of the comparison of proteins of the aphids nourished on pilot diet and those fed with the rifampicine

Keys words: Symbiosis, bacteria, aphids, protéomic.

TABLE DES MATIERES

Remerciements	i
Résumé :	ii
LISTE DES SIGLE ET ABREVIATIONS	vi
LISTE DES TABLEAUX	vii
LISTE DES FIGURES.....	vii
Introduction.....	1
1. Plantes et systèmes de défense	4
2. Les pucerons	6
3. Description approfondie des bactéries et associations symbiotiques chez les insectes :.....	14
3.1.1. Impact de la symbiose sur l'hôte	14
3.1.2. Impact sur le symbiose	15
3.1.3. Les deux partenaires de l'association : Bactérie-puceron	16
3.1.4. Etat des lieux du rôle des symbiontes de pucerons :	19
3.1.5. Traitements antibiotiques :	21
3.1.6 Extraction des symbiontes	21
4. Etat des lieux des techniques d'analyses protéomiques :.....	22
Principe du gel 2D PAGE	23
4.6. Approches alternatives au gel 2D.....	27
L'approche : iTRAQ	30
5. La spectrométrie de masse et les études de protéome :.....	31
1. Conditions de culture et d'élevage des espèces étudiées.....	35
2. Etude de l'adaptation des pucerons : approche biologique	37
3. Etude de l'adaptation des pucerons : approche biochimique	39
3.1.1. Electrophorèse monodimensionnelle :	39
3.1.2. Quantification des protéines totales au spectrophotomètre :.....	40
3.1.3. Préparation des gels d'Acrylamide :	41
3.1.4. Condition d'électrophorèse :	43
3.1.5. Coloration des gels :	43
3.2.1. Lavage des protéines :	44
3.2.2. Préparation des échantillons.....	45
3.2.3. Isoélecrofocalisation :	46
3.2.4. Deuxième dimension (SDS-PAGE) :	47
1.1.1. Effet des antibiotiques sur le développement et la reproduction de <i>M. persicae</i> : ..	49
1.1.2. Effet des antibiotiques sur le développement et la reproduction d' <i>Acyrthosiphon pisum</i> :	55
1.2.1. Evolution de la survie de <i>M. persicae</i> en fonction du temps et du type d'antibiotique après transfert sur <i>Vicia faba</i>	58
1.2.2. Evolution de la fécondité de <i>M. persicae</i> en fonction du temps et du type d'antibiotique après transfert sur <i>Vicia faba</i>	58

1.2.3. Evolution de la survie de <i>M. persicae</i> en fonction du temps et du type d'antibiotique après transfert sur <i>Arabidopsis thaliana</i>	58
1.2.4. Evolution de la fécondité de <i>M. persicae</i> en fonction du temps et du type d'antibiotique après transfert sur <i>A. thaliana</i>	59
1.2.5. Evolution de la survie de <i>A. pisum</i> en fonction du temps et du type d'antibiotique après transfert sur <i>Vicia faba</i>	59
Etude protéomique par électrophorèses à 1 et 2 dimensions	62
2. Discussion :	66
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES	72

LISTE DES SIGLE ET ABREVIATIONS

ADN : Acide désoxyribonucléique

ARN : Acide ribonucléique

PARP : Poly(ADP-ribose)polymérase

HTML : HyperText Markup Language

CID : Dissociation induite par collision

Da : Dalton

DTD : définition du type de documentation

ES : electrospray

ESI-MS : Spectrométrie de masse à ionisation electrospray

EST : Expressed séquence tag (étiquette de séquence transcrise)

HPLC : Chromatographie Liquide Haute Performance

IEF : Isoelectrofocalisation

IPG : gradient de pH immobilisé

LC-MS : Couplage chromatographie liquide – spectrométrie de masse

m/z : rapport masse sur charge

MALDI : ionisation / désorption laser assistée par matrice

MS : Spectrométrie de masse

MS/MS : Spectrométrie de masse en tandem

TOF : temps de vol

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 1 : Caractères des différentes espèces de pucerons utilisées

Tableau 2 : Composition du gel de séparation pour électrophorèse mono-dimensionnelle

Tableau 3 : Composition du gel de concentration pour électrophorèse mono-dimensionnelle

Tableau 4 : Programme de voltage appliqué pendant l'IEF

Tableau 5 : Composition du gel 2D

LISTE DES FIGURES

Figure 1 : Synthèse des substances allelochimiques comme défense de la plante

Figure 2 : Morphologie du puceron

Figure 3 : Pièces buccales du puceron

Figure 4 : *Myzus persicae*

Figure 5 : Schéma de principe et photo (d'après Arnaud, 2007) d'un gel 2D-PAGE

Figure 6 : Stratégie de marquage ICAT

Figure 7 : Dispositif de diète artificielle incluant les antibiotiques

Figure 8 : dispositif gel 1D (François COURAUD, 2006)

Figure 9 : Evolution de la survie de *M. persicae* en fonction du temps sur diète artificielle

Figure 10 : Evolution de la survie de *M. persicae* en fonction de différentes doses de chlortétracycline. Nombre moyen d'adultes survivants. Les barres représentent l'écart type.

Figure 11 : Effet de la chlortétracycline sur la fécondité de *M. persicae* en fonction du temps. Les barres d'erreurs représentent l'écart type.

Figure 12 : Evolution de la fécondité de *M. persicae* en fonction des doses de chlortétracycline

Figure 13 : Evolution de la fécondité de *M. persicae* en des antibiotiques et de la plante

Figure 14 : Evolution de la fécondité de *M. persicae* en fonction du temps (moyen±SD).

Figure 15 : Evolution de la survie d'*A. pisum* sur *Vicia faba*

Figure 16 : Evolution de la survie et de la fécondité d'*A. pisum* en fonction des doses d'ampicilline

Figure 17 : Evolution de la survie et de la fécondité d'*A. pisum* en fonction des doses de rifampicine

Figure 18 : Evolution de la survie d'*A. pisum* sur *Vicia faba*

Figure 19 : Evolution de la survie d'*A. pisum* en fonction des antibiotiques après transfert sur *Vicia faba*

Figure 20 : Evolution de la survie et de la fécondité d'*A. pisum* en fonction du temps et des antibiotiques sur *A. thaliana*

Figure 21 : Comparaison des gels relatifs aux pucerons *A. pisum* élevés sur diète témoin et celle incluant la rifampicine

Figure 22 : Gel d'électrophorèse bidimensionnelle de protéines d'*Acyrthosiphon pisum* élevé sur diète artificielle témoin sans antibiotiques (A) et avec de la rifampicine (B).

Figure 23 : Gels relatifs aux protéomes des symbiontes purifiées d'*A. pisum* et *M. persicae*

Figure 24 : Gel d'électrophorèse bidimensionnelle de protéines des bactéries symbiotiques extraites d'*Acyrthosiphon pisum* (A) et de *Myzus persicae* (B) élevés sur *Vicia faba*.

Introduction

Les pucerons constituent un groupe d'insectes extrêmement répandu dans le monde et qui s'est diversifié parallèlement à celui des plantes à fleurs (Angiospermes) dont presque toutes les espèces sont hôtes d'aphides (Heie, 1987 ; Shaposhnikov, 1987). Il en existe également sur les Gymnospermes, ainsi que sur quelques espèces de Ptéridophytes et Bryophytes. La plupart des genres de pucerons sont inféodés à une famille végétale comme *A. pisum*, en ce sens, ils sont dits monophages. Mais nombre des pucerons s'attaquant aux plantes cultivées ont un régime alimentaire moins restreint et se nourrissent sur des végétaux de familles très distinctes.

La relation entre la plante et l'insecte phytopophage est dynamique et complexe. Dynamique parce que la plante met en œuvre tous les moyens dont elle dispose pour se défendre contre les attaques des phytophages. Ces derniers tentent de s'adapter afin de traverser cette barrière de protection végétale. Tous deux ont le même objectif : survivre pour se reproduire. Complexé parce qu'elle entraîne l'expression d'une multitude de gènes chez les deux protagonistes et qu'elle dépend de leur position systématique ; les espèces végétales présentent différentes défenses et les espèces d'insectes s'adaptent différemment à ces défenses. Cette adaptation des pucerons à leurs plantes hôtes semble résulter notamment de la diversité et de l'abondance de bactéries symbiotiques. En effet, des symbiontes primaires (du genre *Buchnera*) parfois associées à d'autres espèces secondaires (comme les *Rickettsia*) participent activement au métabolisme des pucerons. Ces symbiontes obligatoires (*Buchnera aphidicola*) jouent un rôle essentiel dans l'alimentation du puceron et leur mode de transmission strictement maternel a entraîné une parfaite coévolution entre hôtes et symbiontes (Claude Rispe, 2005).

L'adaptation des pucerons au phloème, un milieu nutritionnel particulièrement déséquilibré semble ainsi être liée à l'acquisition des symbiontes. Par ailleurs, les nouvelles capacités métaboliques et écologiques héritées des symbiontes, isolent écologiquement les groupes qui les possèdent de ceux qui en sont dépourvus. La dépendance mutuelle des deux partenaires montre que l'association entre l'hôte et ses symbiontes est une véritable entité coadaptée. En effet, toutes les tentatives de cultures in vitro de bactéries endosymbiotiques ont jusqu'à présent échoué, confirmant la perte d'autonomie des symbiontes en l'absence de l'hôte (Hinde, 1971b). De plus certaines espèces de pucerons hébergent, en plus de *Buchnera*, des endosymbiontes "facultatifs" (ou "secondaires") qui ne sont pas systématiquement observés

chez toutes les lignées d'une espèce et qui ne sont pas essentiels à la survie individuelle (Buchner 1965 ; Douglas 1989). Le rôle écologique de ces symbiontes demeure encore obscur. Du fait de leur forte prévalence au sein des espèces de puceron et de leurs effets significatifs sur le fitness de l'hôte dans une grande variété de contextes écologiques et environnementaux, les symbiontes facultatifs jouent vraisemblablement un rôle important dans l'écologie et l'évolution des pucerons (Russell et al., 2003). Leur localisation dans le corps du puceron est plus lâche que *Buchnera* et semble inclure l'hémolymphé. Il a été montré pour certains de ces symbiotes peuvent avoir des effets positifs ou négatifs sur des traits majeurs du puceron comme l'utilisation de la plante, la tolérance aux fortes températures, et la résistance aux ennemis naturels (Chen et al., 2000; Wilkinson et al., 2001; Douglas et al. 2002; Montllor et al. 2002; Haynes et al. 2003; Ferrari et al. 2004; Tsuchida et al., 2004; Oliver et al., 2005).

Le présent travail s'inscrit dans une démarche de compréhension de la relation puceron-bactéries symbiotiques. Afin d'identifier le rôle de ces bactéries dans la relation entre les pucerons et leurs plantes hôtes, *Myzus persicae* (espèce généraliste) et *Acyrtosiphum pisum* (spécialiste des Fabaceae) seront utilisés comme modèles élevés sur plusieurs deux plantes hôtes. Les performances biologiques sur ces plantes hôtes des pucerons témoins seront comparées à celles de pucerons préalablement nourris avec des diètes artificielles incluant des antibiotiques (afin de détruire les bactéries symbiotiques). Des gels d'électrophorèse bidimensionnelle seront également réalisés en utilisant 3 types de matériels :

- (1) des pucerons comprenant les symbiontes,
- (2) des pucerons asymbiotiques traités aux antibiotiques,
- (3) des symbiontes suite à leur extraction à partir de pucerons. La composition et la quantité des protéines produites par ces divers échantillons seront déterminées suite à l'analyse des images de ces gels. Les protéines d'intérêt seront ensuite excisées des gels, digérées et identifiées par Maldi-Tof. L'identification des protéines impliquées dans l'adaptation à certaines plantes hôtes sera évaluée en interrogeant successivement les banques de données « pucerons » et « bactéries ».

La fève, *Vicia faba* L., et l'*Arabidopsis thaliana* ont été choisis comme modèles végétaux, le puceron du pêcher, *Myzus persicae* Sulzer (1776) et le puceron du pois *Acyrtosiphum pisum*, comme modèle insecte. La fève et l'*Arabidopsis thaliana* ont été retenues pour faire ressortir le caractère polyphage de *M. persicae* et monophage d'*A. pisum*.

Objectifs du travail

L'objectif global de ce travail est de contribuer à l'étude du rôle des bactéries symbiotiques des pucerons dans l'adaptation aux plantes hôtes.

À cet effet, deux parties sont envisagées :

1. La première partie du travail porte d'une part sur l'étude des performances biologiques des pucerons sur un système de diète artificielle incluant trois antibiotiques : la rifampicine, la chlortétracycline et l'ampicilline ; d'autre part l'évaluation des performances des pucerons aposymbiotiques après leur transfert sur deux plantes de familles botaniques différentes (*Vicia faba* et *Arabidopsis thaliana*). Deux espèces de pucerons sont utilisées : *Myzus persicae* et *Acyrthosiphum pisum*. Il s'agit d'étudier les effets de :

- ♦ De trois antibiotiques sur le développement et la fécondité des pucerons en fonction de différentes doses

2. La deuxième partie porte une approche biochimique. Il s'agit de réaliser des gels d'électrophorèse mono et bidimensionnelle en utilisant trois types de matériels :

- ♦ Des pucerons comprenant les symbiontes,
- ♦ Des pucerons aposymbiotiques traités aux antibiotiques,
- ♦ Des symbiontes suite à leur extraction à partir des pucerons.

La composition et la quantité des protéines produites par ces divers échantillons seront déterminées suite à l'analyse des images de ces gels

PREMIERE PARTIE : ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE

GENERALITES

1. Plantes et systèmes de défense

Une plante dans son environnement est continuellement soumise à diverses agressions, quelles soient biotiques (agents pathogènes) ou abiotiques (stress hydrique, thermique, chimique). Bien que dépourvue d'un système immunitaire évolué, chaque plante n'est sensible qu'à quelques un des multiples agresseurs potentiels. Elles possèdent des barrières chimiques et mécaniques préformées, et des systèmes de défense inductibles, qui font que dans la nature "la maladie est plutôt l'exception que la règle". L'activation des mécanismes de défense des plantes résulte d'une cascade d'événements au cours desquels les plantes supérieures et les agents pathogènes échangent des signaux moléculaires. La phase clé dans tout système de défense inductible efficace est la perception de l'agresseur. Les plantes sont capables de reconnaître les composés produits ou relargués par l'agresseur. Ces composés sont appelés éliciteurs ou stimulateurs de défenses naturelles (SDN). Le terme "éliciteur" englobe à la fois les substances issues du pathogène (éliciteur exogène) et les composés relargués par la plante suite à l'action du pathogène (éliciteurs endogènes). Ceux-ci ont la propriété d'accroître la résistance des plantes aux agresseurs biotiques et ils stimulent également la production de substances permettant une meilleure résistance des plantes aux stress pédoclimatiques ou nutritionnels (http://www.univlehavre.fr/enseign/fst/projets/algues/Pages/SSrubrique13_d%20fense_v%20g%20taux.htm).

Mécanismes de défense de la plante :

On note deux mécanismes de défense chez les plantes. Ceux dits de défense indirectes, qui mettent en jeu notamment les prédateurs et les parasitoïdes des insectes phytophages. La plante va donc, émettre des signaux détectables par ces auxiliaires pour leur indiquer la présence de proies ou d'hôtes potentiels. Les mécanismes de défense directes quand à eux ont, comme leur nom l'indique, un effet immédiat sur le ravageur en affectant négativement leur physiologie à l'aide de substances toxiques ou antinutritionnelles, ou encore en interférant dans leur comportement grâce à des substances répulsives.

Les plantes ne se laissent pas attaquer par les pucerons sans réagir. Elles produisent des composés secondaires : l'acide salicylique et l'acide jasmonique qui contribuent à déclencher une réaction de défense face aux agressions des insectes. La zone touchée peut se nécroser pour stopper l'extension du puceron.

En contrepartie, le puceron cherche à contourner le mécanisme de défense de la plante en inhibant l'action des composés secondaires à partir des enzymes contenues dans sa salive(<http://taste.versailles.inra.fr/inapg/aphidsmania/environnement/defense.htm>)

Ces composés chimiques secondaires non directement liés au métabolisme de base peuvent engendrer une réduction de l'acceptabilité de la plante vis-à-vis de ses ravageurs. Sous l'effet de la pression de la sélection naturelle, les plantes ont ainsi développé la capacité de synthétiser ou accumuler des toxiques pouvant être classés en plus de 12 groupes distincts (www.fsagx.ac.be/zg/Recherche/Ecologie%20des%20sémiochimiques.htm).

Pour réduire l'alimentation des insectes phytophages, la plante ne doit pas nécessairement produire une substance hautement毒ique pour l'insecte. Deux termes sont couramment utilisés lorsque l'on se réfère aux substances chimiques impliquées dans les préférences alimentaires des insectes : les attractifs (ou stimulant) et les répulsifs. Le même composé peut néanmoins jouer à la fois le rôle de stimulant pour certaines espèces et répulsif pour d'autres.

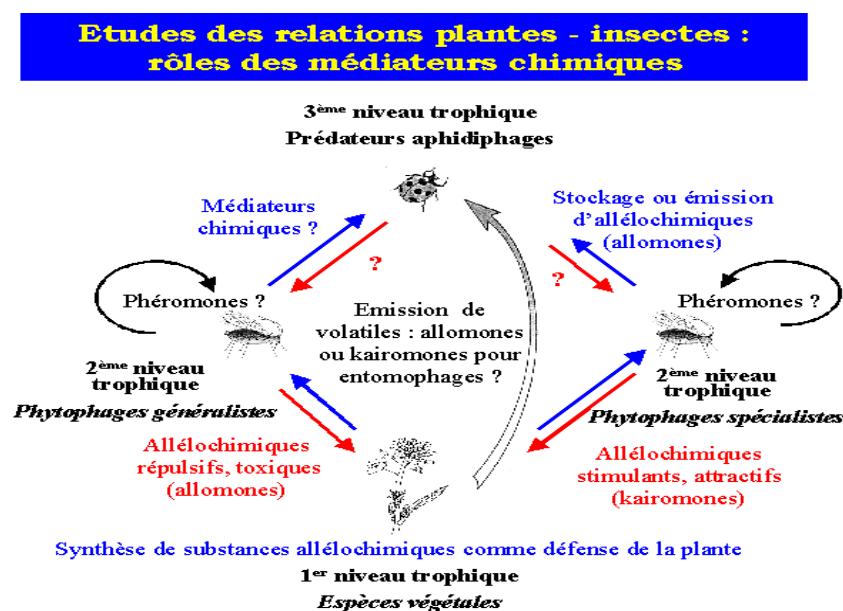


Figure 1 : Synthèse des substances allelochimiques comme défense de la plante
[\(www.fsagx.ac.be/zg/Recherche/Ecologiesémiochimiques.htm\)](http://www.fsagx.ac.be/zg/Recherche/Ecologiesémiochimiques.htm).

2. Les pucerons

2.1. Généralités

Position systématique

Quatre mille espèces de pucerons sont recensées dans le monde. Elles appartiennent à l'ordre des Hémiptères, au sous-ordre des Homoptères et sont réparties au sein de 4 familles : les Aphididae, les Eriosomatidae, les Phylloxeridae et les Adelgidae (Dixon, 1998).

Morphologie (figure 1)

Les pucerons ont une taille comprise entre 2 et 5 mm. Les antennes ont généralement 6 articles sur lesquels apparaissent les rhinaries qui sont des organes olfactifs. Le dernier article comporte une partie terminale le plus souvent effilée : le fouet. Le thorax, composé de 3 segments, porte 3 paires de pattes qui se terminent par des tarses à 2 articles. La forme ailée porte, sur le thorax, 2 paires d'ailes membraneuses repliées verticalement au repos. L'abdomen comporte 9 segments. Le cinquième porte les cornicules, protubérances servant à la libération d'une phéromone d'alarme, l'E- β farnesène. Le dernier porte la cauda (Hullé et al., 1999).

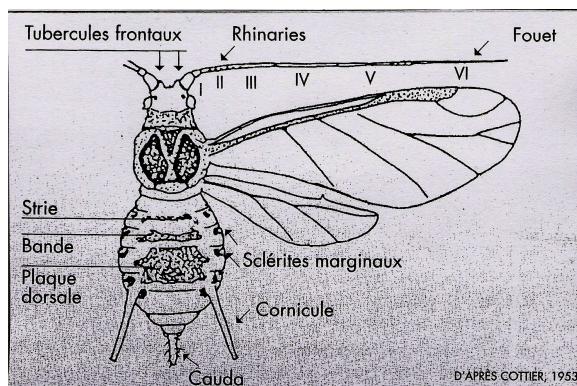


Figure 2 : Morphologie du puceron
(Hullé et al., 1999)

Régime alimentaire

Les pucerons sont phytophages et disposent d'un appareil buccal de type piqueur-suceur. Les pièces buccales (figure 3) sont conçues pour percer la paroi du végétal, atteindre la sève élaborée et la prélever. Elles sont constituées d'une paire de stylets mandibulaires externes et d'une paire de stylets maxillaires internes, toutes deux engainées par le labium et le labre.

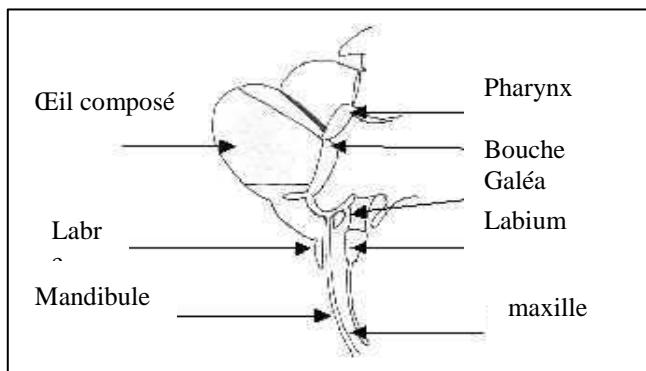


Figure 3 : Pièces buccales du puceron
(<http://www.earthlife.net/insects/aphids.html#4>, in
Harmel, 2006)

La sève du phloème est riche en sucre et pauvre en acides aminés. A titre d'exemple, la concentration en sucre de la sève élaborée de *Ricinus communis* L. est de 80 à 106 mg/ml, tandis que la concentration en acides aminés n'est que de 5,2 mg/ml (Taiz et Zeiger, 1998). Les pucerons prélevent suffisamment de sève pour couvrir leur besoin en acides aminés, ce qui implique un excès de sucres prélevés. C'est pour cette raison qu'ils excrètent le surplus de sucre sous forme d'un liquide visqueux appelé miellat (Minks et Harrewijn, 1988). Cependant les acides aminés essentiels sont présents en très faible concentration dans le phloème et représentent seulement 10 à 30% de l'ensemble des acides aminés (Abisgold et al., 1994). Pour pallier à cette déficience, presque tous les pucerons contiennent des endosymbiontes localisés dans des cellules polyploïdes spécialisées (bactériocytes) localisées dans l'hémolymphe de l'insecte et abritant *Buchnera aphidicola*, une Enterobacteriaceae proche d'*Escherichia coli* qui complémente l'alimentation de son hôte en lui fournissant les acides aminés essentiels absents de son milieu nutritionnel.

Le mode de nutrition des pucerons engendre plusieurs types de réactions chez la plante qui peut réagir à la piqûre ou à la toxicité de la salive, elle peut s'affaiblir suite à la perte de sève élaborée, elle peut être infectée par un virus phytopathogène, enfin, le miellat rejeté par le

puceron peut constituer un milieu de développement pour les fumagines qui entravent alors la respiration de la plante et l'assimilation chlorophyllienne (Hullé et al., 1999).

Mode de reproduction

Les espèces qui ne se multiplient que par parthénogénèse sont dites anholocycliques, une femelle dite parthénogénétique donnant directement naissance à d'autres femelles parthénogénétiques, sans avoir été fécondée par un mâle. Ce type de cycle se rencontre généralement dans les régions à hiver doux ou dans les milieux abrités où les pucerons peuvent survivre au froid hivernal. Une espèce dont la phase de multiplication parthogénétique est entrecoupée d'une phase de reproduction sexuée est dite holocylique. Des individus sexués, femelles fécondables et mâles, apparaissent à l'automne. Après fécondation, les œufs sont déposés sur une plante hôte où ils vont rester tout l'hiver. La phase parthénogénétique reprendra au printemps suivant à partir de l'éclosion de ces œufs (Hullé et al., 1999).

Comportement alimentaire

Une espèce qui accomplit la totalité de son cycle de développement sur des plantes de la même espèce ou d'espèces très voisines et apparentées sur le plan botanique est dite monoécique. Une espèce qui a besoin de deux plantes hôte de familles botaniques différentes pour accomplir son cycle est dite dioécique. Elle vit de l'automne au printemps sur une plante hôte en général pérenne (arbre ou arbuste) sur laquelle a lieu la reproduction sexuée et qui est alors qualifiée d'hôte primaire. Au printemps, elle migre sur des plantes herbacées alors qualifiées d'hôtes secondaires (Hullé et al. ,1999).

Les pucerons se nourrissent exclusivement de la sève phloémienne des plantes qui est composée essentiellement de sucres, et tout particulièrement de saccharose qui associe une grande stabilité chimique et une faible viscosité en solution concentrée. Les principaux composants azotés sont des acides aminés libres dont la concentration est comprise entre 50 et 800 mM. Les acides aminés les plus représentés sont généralement le paspartate, le glutamate, l'asparagine et la glutamine. Les acides aminés essentiels, c'est-à-dire les acides aminés que les animaux ne peuvent synthétiser de novo, sont pour les pucerons aposymbiotiques, l'histidine, l'isoleucine, la leucine, la lysine, la méthionine, la phénylalanine, la thréonine, le tryptophane et la valine (Mittler, 1971). Ils sont présents en faible concentration (Sandstrom et Moran, 2001, Sandstrom et al., 2000) et représentent seulement 10 à 30 % de l'ensemble des acides aminés (Abisgold et al., 1994). Enfin, le phloème contient des substances inorganiques.

Il s'agit principalement de potassium et de phosphate à une concentration de l'ordre de 1 à 5 g/l et de micronutriments (fer, manganèse, zinc, cuivre et molybdène). En revanche, les lipides tout comme les stérols ne sont présents qu'en infimes quantités dans la sève.

Le saccharose et les acides aminés, en tant que principales sources respectivement de carbone et d'azote dans la sève phloémienne, ont fait l'objet de nombreuses études nutritionnelles chez le puceron. Il a ainsi été observé que la prise alimentaire des pucerons varie en fonction de la teneur nutritive de ces deux sources alimentaires. Des études ont montré que le saccharose à une concentration supérieure à 0,1 M et la méthionine peuvent être considéré comme des phagostimulants. De plus, les pucerons adoptent des réponses nutritionnelles compensatoires en augmentant leur prise alimentaire en présence d'un aliment contenant de faibles concentrations en saccharose (Abisgold et al., 1994). De la même façon, les pucerons montrent une réponse alimentaire compensatoire pour des concentrations en acides aminés comprises entre 75 et 250 nM, mais pas pour des concentrations plus élevées (Abisgold et al., 1994). En revanche, ce mécanisme est altéré chez les pucerons aposymbiotiques (Presser et al., 1992).

Utilisation du saccharose :

Le saccharose présent en très forte concentration dans la sève phloémienne est responsable d'une pression osmotique deux à quatre fois plus élevée que celle des fluides de l'insecte (Douglas et al., 2001). Le puceron a donc développé des stratégies lui permettant de maintenir l'équilibre hydrique et d'acquérir les autres nutriments de la sève en quantité suffisante (Rhodes et al., 1997 ; Wilkinson et al., 1997). Il est capable de diminuer cette pression par la production d'oligosaccharides à partir des sucres du milieu et cela, indépendamment de la présence de *Buchnera*, l'endosymbionte primaire (Wilkinson et al., 1997).

Les pucerons utilisent essentiellement le saccharose comme source d'énergie (Febvay et al., 1995 ; Rhodes et al., 1996). Cependant, bien que le saccharose soit composé d'un glucose et d'un fructose, les pucerons utilisent préférentiellement le fructose, et pour de fortes concentrations en saccharose, éliminent le glucose sous forme d'oligosaccharides retrouvés dans le miellat (Ashford et al., 2000).

Utilisation des acides aminés

Si le puceron utilise le saccharose comme source d'énergie, les acides aminés sont par contre réservés à la production de composés structuraux (Rhodes et al., 1996). Les acides aminés aromatiques comme la tyrosine et son précurseur, la phénylalanine, sont ainsi des

acides aminés indispensables au développement larvaire des insectes (Dadd, 1973). Ils interviennent tout particulièrement dans la formation de l'exosquelette, fondamental pour le développement des insectes qui synthétisent une nouvelle cuticule après chaque mue larvaire. Les pucerons sont capables de survivre sur différentes plantes hôtes dont les phloèmes contiennent des proportions extrêmement variables en acides aminés (Bernays et Klein, 2002, Sandstrom et Pettersson, 1994). Il est à noter que même sur une plante hôte unique, la composition du phloème varie parfois dans des proportions importantes suivant la localisation de la plante, la saison, en réponse à la prise alimentaire des pucerons (Telang et al., 1999) ou encore sous l'effet de champignons pathogènes (Johnson et al., 2003). Des études ont donc été menées pour étudier l'impact de la concentration en acides aminés essentiels dans le milieu nutritionnel des pucerons. Il a ainsi été montré qu'une variation de la concentration en acides aminés essentiels comprise entre 20 % (taux de la sève phloémienne) et 50 % (taux des milieux artificiels) de la totalité des acides aminés du milieu n'a pas de répercussion sur leur croissance (Prosser et Douglas, 1992). En revanche pour des concentrations plus faibles, le poids des pucerons diminue.

Myzus persicae

Le puceron vert du pêcher (Figure 4) appartient à l'ordre des Homoptères et à la famille des Aphididae.

Les formes aptères, de couleur vert clair ou vert jaunâtre, ont une longueur comprise entre 1,2 et 2,5 mm. Les tubercles frontaux convergent. Les cornicules sont assez longues et claires. Les formes ailées ont une longueur comprise entre 1,4 et 2,3 mm. Les antennes sont longues et pigmentées, sauf à la base de l'article III. Le front présente des tubercles proéminents et à bords convergents. L'abdomen présente une large plaque discale sombre, échancrée latéralement et perforée. Les cornicules sont longues, sombres et renflées. La cauda est en forme de doigt (Hullé et al., 1999).

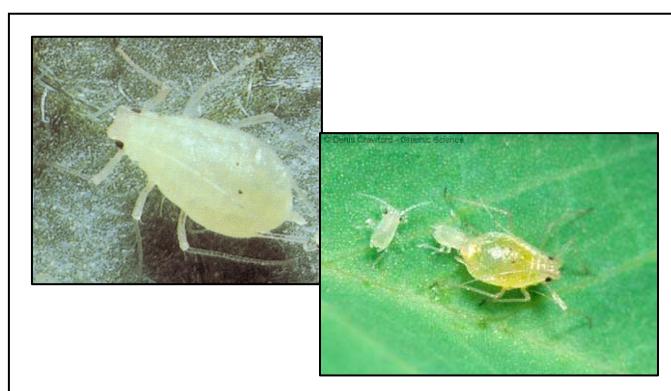


Figure 4 : *Myzus persicae*
[\(<http://www.graphicscience.com.au/Gallery/Insect%20Pests/PestsPic2.thm>\)](http://www.graphicscience.com.au/Gallery/Insect%20Pests/PestsPic2.thm)

M. persicae peut présenter deux cycles différents. L'espèce est soit holocylique dioécique et alterne entre des hôtes primaires du genre *Prunus* et des hôtes secondaires herbacés, soit anholocylique sur hôtes secondaires quand l'hôte primaire est absent ou lorsque le climat doux en hiver lui permet de survivre par parthénogenèse. Dans ce cas, l'insecte ne retourne pas sur les arbres en automne. Ainsi, *M. persicae* est anholocylique dans l'ouest et le nord de la France où le pêcher est absent ou rare. Par contre, il est holocylique dans le Bassin méditerranéen ou la vallée du Rhône où le pêcher est abondant (Hullé et al., 1999).

Quand les populations sont holocycliques, les œufs déposés en automne sur diverses espèces du genre *Prunus* éclosent entre fin janvier et fin avril selon les régions. La larve se développe et les adultes apparaissent trois semaines plus tard. La première génération de femelles parthénogénétiques, dites fondatrices, produit en moyenne 40 à 50 larves aptères qui donnent naissance à des individus aptères ou ailés (Hullé et al., 1999).

M. persicae n'a pas les mêmes hôtes selon la saison. En hiver, l'hôte primaire de *M. persicae* est *Prunus persicae*, alors qu'en été, *M. persicae* est fortement polyphage : les plantes-hôte sur lesquelles il se développe appartiennent à plus de 40 familles différentes avec, entre autres, les Brassicaceae, les Solanaceae, les Poaceae, les Fabaceae, les Cyperaceae, les Convolvulaceae, les Chenopodiaceae, les Asteraceae, les Cucurbitaceae et les Apiaceae. *M. persicae* dispose de plus de 50 hôtes primaires et de plus de 40 hôtes secondaires (Hullé et al., 1999).

M. persicae est l'espèce de puceron qui véhicule le plus de virus phytopathogènes. Il peut transmettre plus de 100 maladies virales à plus de 400 plantes-hôte de 50 familles différentes incluant des espèces cultivées (Cabi, 1999).

Cette capacité, à utiliser une large gamme de sources de nourriture est étroitement liée à un potentiel élevé de système d'adaptation pour faire face à divers mécanismes de défense de la plante hôte. D'autre part, les plantes hôtes ont développé une multitude de mécanismes de défense constitutifs pour faire face aux attaques des herbivores

***Acyrthosiphon pisum* :**

Le puceron du pois *Acyrthosiphon pisum* appartient à la famille des Aphididae et à l'ordre des Hémiptères. Les adultes aptères ou ailés ont un cycle de reproduction annuel hétérogonique impliquant une alternance de plusieurs générations parthénogénétiques (les femelles produisent leur descendance sans accouplement) et une seule génération sexuée. Les femelles parthénogénétiques sont toujours vivipares, c'est-à-dire qu'elles donnent naissance à de jeunes larves capables de s'alimenter et de se déplacer immédiatement. Ce cycle complexe lui

permet d'exploiter de façon optimale les ressources de sa plante hôte (Baumann et Baumann, 1994).

De nombreuses espèces d'insectes phytophages sont structurées en populations sympatriques spécialisées sur des plantes différentes, et que l'on désigne par le terme de races d'hôte. Ces races sont un modèle privilégié pour l'étude de la spéciation par changement d'hôte. Le puceron du pois *Acyrthosiphon pisum*, parasite de fabacées, est connu pour ses races d'hôtes spécialisées sur trèfle, pois ou luzerne ou encore fève (J. Peccoud et al., 2006)

2.2. Systèmes d'adaptations des insectes face aux défenses végétales

Les insectes phytophages généralistes se nourrissent au détriment d'une large gamme de plantes hôte, tandis que les insectes phytophages spécialistes se nourrissent au détriment de peu d'espèces végétales apparentées. Le généraliste doit donc disposer de mécanismes d'adaptation plus complexes et polyvalents puisqu'il doit faire face à une plus large gamme de composés chimiques défensifs.

Adaptations aux inhibiteurs de protéases

Certains insectes s'adaptent aux inhibiteurs de protéases en surproduisant des protéases digestives identiques à celles qui existent déjà (De Leo et al., 1998). D'autres produisent des protéases insensibles aux inhibiteurs (Bolter et Jongsma, 1995).

D'autres encore produisent plusieurs isoformes de protéases présentant une sensibilité variable à un même inhibiteur de protéase (Orr et al., 1994). Enfin, les inhibiteurs de protéases du végétal peuvent être inactivés directement par la protéolyse de l'insecte (Zhu-Salzman et al., 2005).

Systèmes d'adaptation connus chez les pucerons

En présence de MS dans la plante hôte mais aussi en utilisant des diètes artificielles contenant ces substances, des GST ont été identifiés chez *M. persicae* comme participant à l'adaptation du puceron au mécanisme de défense végétale. Ces GST ont été purifiées par chromatographie d'affinité et caractérisées mais pas séquencées (Francis et al., 2005 cité par Nicolas, 2005).

L'adaptation des pucerons à leurs plantes-hôtes

Les pucerons constituent un groupe d'insectes extrêmement répandu dans le monde et qui s'est diversifié parallèlement à celui des plantes à fleurs (Angiospermes) dont presque toutes les espèces sont hôtes d'aphides (Heie, 1987 ; Shaposhnikov, 1987). Il en existe également sur les Gymnospermes, ainsi que sur quelques espèces de Ptéridophytes et Bryophytes. La plupart

des genres de pucerons sont inféodés à une famille végétale comme *A. pisum*, en ce sens, ils sont dits monophages. Mais nombre des pucerons s'attaquant aux plantes cultivées ont un régime alimentaire moins restreint et se nourrissent sur des végétaux de familles très distinctes. L'espèce *A. gossypii* est l'archétype des pucerons polyphages, elle se développe aussi bien sur le coton (Malvacée), que sur le melon (Cucurbitacée). C'est dans les zones tempérées que l'aphidofaune est la plus variée. Mais ces insectes sont présents aussi bien sous les climats tropicaux que dans les zones subarctiques (Dixon, 1987 ; Strathdee et al., 1993 ; Bale et al., 1994 ; Heie, 1994).

D'un point de vue général, les aphides possèdent les caractéristiques suivantes :

- ils sont paurométaboles : leurs différents stades larvaires ressemblent aux adultes (mis à part l'absence d'ailes développées pour les futurs ailés), ont le même mode de vie, se nourrissent de la même manière et font les mêmes types de dégâts que ces derniers ;
- ils sont plurivoltins et présentent donc plus de deux générations par an. Leur cycle évolutif est hétérogonique, c'est-à-dire caractérisé par l'alternance entre une génération amphi sexuelle (comportant des mâles et des femelles fécondables) et une ou généralement plusieurs générations ne comportant que des femelles parthénogénétiques. Les femelles fécondées sont toujours ovipares, alors que les femelles parthénogénétiques sont vivipares (elles donnent directement naissance à de jeunes larves capables de s'alimenter et de se déplacer aussitôt produites). Dans les régions tempérées, les pucerons présentent en général un cycle annuel complet (holocycle).

L'adaptation des pucerons au phloème au milieu très déséquilibré et très pauvre en métabolites secondaires semble être liée à l'acquisition des symbiontes. Les bactéries symbiotiques ont donc manifestement contribué à la diversification des formes d'exploitation du milieu et à l'extrême diversité des espèces en particulier chez les insectes (CEDRIC Lefèvre, 2004).

3. Description approfondie des bactéries et associations symbiotiques chez les insectes :

3.1. Généralités sur la symbiose

Les bactéries symbiotiques obligatoires (*Buchnera aphidicola*) jouent un rôle essentiel dans l'alimentation du puceron et leur mode de transmission strictement maternel a entraîné une parfaite coévolution entre hôtes et symbiontes (Claude Rispe, 2005).

Les modèles de symbiose sont extrêmement variés et concernent l'ensemble des organismes vivants, des unicellulaires procaryotes aux organismes supérieurs animaux ou végétaux. Lorsque deux partenaires sont impliqués dans la relation, on parle de monosymbiose. Il existe cependant des cas de plurisymbiose dans lesquels plusieurs symbiotes sont associés et parfois imbriqués dans le même hôte. L'exemple le plus célèbre est peut-être celui du termite *Afacrotermes dariviniensis* (cité dans Smith et Douglas, 1987) hébergeant dans son tube digestif un flagellé *Mixotrichia paradoxa*, lui-même associé à plusieurs bactéries symbiotiques extra et intracellulaires.

La localisation des symbiontes permet également de distinguer plusieurs formes de symbioses.

Mais outre son intérêt pour les biologistes cellulaires et les évolutionnistes, la symbiose revêt aussi une importance économique, notamment en ce qui concerne les modèles insectes. En effet, de nombreux ravageurs doivent leur extraordinaire potentiel d'invasion et de multiplication à l'apport énergétique fourni par leurs symbiotes (Grenier *et al.*, 1986 dans Hubert Charles, 1997). Une meilleure compréhension des mécanismes d'interaction hôte/symbiotes permettrait peut-être d'envisager le développement de nouveaux moyens de lutte contre les ravageurs.

3.1.1. Impact de la symbiose sur l'hôte

Le rôle de la symbiose intracellulaire dans le pouvoir adaptatif des hôtes à des environnements très différents a longtemps été ignoré ou sous-estimé (Nancie Raymond, 2004). L'adaptation des pucerons au phloème, un milieu nutritionnel particulièrement déséquilibré semble ainsi être liée à l'acquisition des symbiontes. Par ailleurs, les nouvelles capacités métaboliques et écologiques héritées des symbiontes, isolent écologiquement les groupes qui les possèdent de ceux qui en sont dépourvus. En ce sens, la symbiose

intracellulaire favoriserait la divergence des populations et pourrait représenter une barrière écologique favorable à la spéciation sympatrique(Adrien FRANTZ, 2005).

3.1.2. Impact sur le symbiose

La vie intracellulaire et la transmission maternelle des symbiotes favorisent une évolution originale des génomes. Tant pour les endocytobiotiques que pour les parasites intracellulaires, il a été observé un manque de recombinaisons génétiques, une fixation importante de mutations délétères acquises par dérive génétique, un taux de mutations important et un biais mutationnel élevé (Werneck, 2002).

Le manque de recombinaisons génétiques dans les populations d'endocytobiotiques résulte d'une part de la séquestration des symbiontes dans les cellules hôtes et d'autre part de la perte possible de certains éléments (comme les séquences répétées ou les transposons) qui sont impliqués indirectement dans la recombinaison. Par ailleurs, le fait que seul un petit nombre de symbiotes soit transmis à la descendance de l'hôte à chaque génération a pour conséquence une diminution drastique de l'effectif efficace de la population. Ce phénomène appelé « Midlers ratchet » ou « cliquet de Muller » (processus nommé ainsi après avoir été décrit pour la première fois par Muller en 1964) ou « goulots d'étranglement » se traduit en effet par une accélération de la dérive génétique qui favorise la fixation de mutations délétères (Moran, 1996).

Ce manque de recombinaisons et cette accélération de la dérive génétique aboutissent à une augmentation de la vitesse d'évolution chez les symbiontes intracellulaires. Parallèlement, les génomes symbiotiques présentent une accumulation très importante de bases A et T, aussi bien dans les régions codantes que non codantes. Ce phénomène, qui a également été observé dans les mitochondries (Crozier et Crozier, 1993), semble être une caractéristique des génomes des organismes vivant dans un milieu intracellulaire. Son origine et les pressions sélectives qui le maintiennent ne sont pas encore complètement élucidées bien qu'une nette corrélation entre taux de GC et taille des génomes bactériens ait été observée. Certains auteurs l'expliquent par une déficience ou une absence des enzymes capables de corriger les erreurs de réPLICATION (Werneck, 2002). D'autres se basent sur une « faiblesse » de la polymérase dans les régions de l'ADN déjà particulièrement riches en bases A qui aurait pour conséquence l'ajout de bases A et T par l'enzyme dans ces régions (Ramas, 2002).

La dépendance mutuelle des deux partenaires montre que l'association entre l'hôte et ses symbiontes est une véritable entité coadaptée. En effet, toutes les tentatives de cultures *in vitro* de bactéries endocytobiotiques ont jusqu'à présent échoué, confirmant la perte

d'autonomie des symbiontes en l'absence de l'hôte (Hinde, 1971b). Parallèlement, dans le cas de symbioses anciennes, l'hôte ne survit pas ou est généralement très diminué en l'absence de ses symbiotes. Cet état de coadaptation est souvent le résultat d'une longue coévolution entre les deux génomes des partenaires.

Mais plus encore que cet aspect de coévolution, il est possible de voir le symbionte comme un ensemble de gènes prêts à s'exprimer, acquis simultanément et transmis à toute la descendance par voie maternelle. Ce processus d'acquisition génique est donc bien plus efficace que la mutagenèse ou les remaniements chromosomiques. En ce sens, la symbiose apparaît comme un mécanisme sophistiqué de prédatation génique et comme la source d'innovation la plus efficace. Elle ne peut pas s'interpréter bien sûr en termes de gradualisme dans la mesure où le symbiocosome est en fait un groupe de génomes qui ne dérivent pas les uns des autres, mais se sont assemblés selon un processus particulier (Nardon, 1995).

3.1.3. Les deux partenaires de l'association : Bactérie-puceron

La symbiose puceron - bactéries est un modèle étudié depuis de nombreuses années dans les laboratoires, en raison des caractéristiques inhabituelles de sa physiologie nutritionnelle et de son impact agronomique. En effet, le puceron se nourrit exclusivement du phloème des plantes qui est un liquide de haute pression osmotique excessivement déséquilibré. Pour survivre sur ce milieu pauvre et fortement osmotique, le puceron a développé d'une part de remarquables adaptations anatomiques, physiologiques et biochimiques et d'autre part une intime symbiose avec des micro-organismes, et principalement avec une bactérie du genre *Buchnera*, qui l'approvisionne en nutriments difficiles à obtenir directement du phloème (Nancie Raymond, 2004).

Cette association est indispensable pour le puceron comme pour *Buchnera*. En effet, il est possible d'éliminer les bactéries des pucerons par un traitement antibiotique, mais ces pucerons dépourvus artificiellement de bactéries (appelés pucerons aposymbiotiques) présentent une croissance fortement ralentie et leur descendance n'est pas viable (Douglas, 1992 ; Mailer, 1971). De même la bactérie *Buchnera* peut être isolée par dissection mais ne survit que quelques heures en dehors du puceron (Whitehead et Douglas, 1993b).

La compréhension des mécanismes d'adaptation de la symbiose puceron - bactérie au phloème est un premier pas pour appréhender le fonctionnement global de ce système. Au-delà de cet intérêt académique, cette compréhension permettra éventuellement de lutter plus efficacement contre le puceron du pois (*A. pisum*) et le puceron du pêcher (*M. persicae*), véritables

ravageurs des cultures légumières, tant par ses dommages directs que par la transmission de virus aux plantes dont ils sont responsables (Nancie Reymond, 2004).

Parmi les micro-organismes présents chez le puceron, *Buchnera aphidicola*, avec un génome extrêmement réduit :(619 gènes), sur lequel environ 10% contribue à la biosynthèse de acides aminés essentiels dont l'hôte à besoin représente plus de 90% des bactéries (Moran et al., 2005). Le génome de *Buchnera* (entièrement séquencé) se caractérise par une « hyperspecialisation » : la bactérie a perdu tous les gènes devenus inutiles face à la stabilité des conditions environnementales intracellulaires, alors qu'elle a conservé les gènes essentiels à la fonction symbiotique. Elle semble avoir perdu l'essentiel des régulateurs transcriptionnels spécifiques connus chez les bactéries libres alors qu'elle a conservé certains de ses régulateurs globaux (http://www.inra.fr/internet/Projets/agroBI/RESUMES/P03_Charles.doc). Par opposition, les bactéries restantes sont appelées symbiontes secondaires ou parfois bactéries accessoires (comme les *Rickettsia*). Ces symbiontes secondaires ne sont pas présents de façon universelle dans les populations naturelles de pucerons. Chez les pucerons qui en possèdent, elles peuvent se trouver dans l'hémolymphe des insectes comme dans certaines cellules de l'appareil digestif (Darby et al., 2001 ; Fukatsu et al., 2000 ; Sandstrom et al., 2001).

Le rôle joué par les symbiontes intracellulaires dans l'homéostasie a été étudié en utilisant des pucerons aposymbiotiques élevés sur diète artificielle. Les pucerons traités ont un contenu d'acides aminés plus élevé que ceux non traités. Ces résultats confirment l'hypothèse selon laquelle les bactéries symbiotiques contribuent à la nutrition des pucerons par la synthèse des acides aminés essentiels (Moran et al., 1994). De multiples bactéries endosymbiotiques cohabitent dans le même organisme hôte mais le rôle joué par chacun est mal connu(.). Au Japon des études menées sur des populations *A. pisum* ont montré qu'en plus de *Buchnera aphidicola*, d'autres types d'endosymbiontes facultatifs coexistent : *Serratia symbiotica*, *Rigiella insecticola*, *Rickettsia sp.* (Moran et al., 2005)

La population de bactéries augmente durant les stades larvaires, pour atteindre son maximum durant la période de reproduction des jeunes adultes et finalement décliner chez les pucerons âgés (Koga et al., 2003). La dynamique de la population des symbiontes reflète donc l'activité biologique des pucerons, suggérant un éventuel contrôle de leur prolifération par le puceron (Moran et al., 1993).

Contrairement aux symbiontes secondaires, *Buchnera* est localisée dans des structures particulières. Il s'agit de cellules polyploïdes appelées bactériocytes (Griffiths et Beck, 1973) dont la seule fonction est apparemment d'assurer la survie des bactéries qui occupent 60 à 70

% de leur cytoplasme (Whitehead et Douglas, 1993a). Un puceron adulte possède entre 60 et 80 bactériocytes, contenant au total plus de 5 millions de bactéries (Baumann, 1994 ; Douglas et Dixon, 1987). Ces bactériocytes sont regroupés dans une structure bilobée appelée bactériome qui est située dans l'hémolymphé de l'insecte à proximité des ovarioles (Baumann et al., 1995). À l'intérieur du cytoplasme des bactériocytes, les bactéries sont entourées individuellement ou par petits groupes, d'une membrane d'origine eucaryote appelée membrane symbiosomale. Bien que les propriétés de cette membrane n'ont pas encore été élucidés, elle joue probablement un rôle clé dans l'association symbiotique en contrôlant les entrées et les sorties de nutriments.

Les bactéries sont transmises par voie verticale aux embryons, via les ovaires maternels (Baumann et Baumann, 1994). Chez les pucerons ovipares, un mécanisme d'exocytose assure le transfert des bactéries à œuf non fécondé tandis que chez les pucerons vivipares les bactéries sont transmises aux embryons au cours du stade blastoderme (Brough et Dixon, 1990 ; Hinde, 1971a). Il existe deux populations distinctes de bactériocytes chez les embryons. La première population est présente avant la transmission des bactéries maternelles aux embryons et la seconde, qui apparaît plus tard au cours du développement, rejoint ensuite les premières cellules. La mise en place de ces deux populations cellulaires ne dépend pas de *Buchnera* car même en l'absence de symbiotes, la formation des bactériocytes est initiée (Braendle et al., 2003).

Associée à tous les pucerons d'intérêt agronomique, *Buchnera aphidicola* est l'une des bactéries symbiotiques intracellulaires d'insecte les plus étudiées au monde. L'intérêt agronomique de *Buchnera* est lié à son implication dans la physiologie de son hôte. En effet, c'est en partie grâce à leurs bactéries symbiotiques que les pucerons se développent et se multiplient très efficacement sur de nombreuses plantes sauvages et cultivées. *Buchnera* fournit notamment les vitamines et les acides aminés essentiels que le puceron ne trouve pas dans son alimentation, la sève phloémienne des plantes. *Buchnera* participe ainsi au développement de son hôte, mais également à son adaptation et à son évolution (Hubert Charles, 1997).

Les pucerons sont des insectes hautement spécialisés se nourrissant de la sève des plantes dont la composition en acides aminés est très déséquilibrée. Pourtant sur ce milieu, le puceron croît et se reproduit rapidement. Cette réponse adaptative suppose que cet insecte présente un important métabolisme intermédiaire. Dans ce contexte, le pool d'acides aminés libres du puceron du pois *Acyrthosiphon pisum* élevé sur plante hôte, *Vicia faba*, ou sur trois milieux artificiels de composition différente en acides aminés a été analysé. Quelle que soit la

composition en acides aminés du milieu alimentaire (de composition équilibrée à très déséquilibrée), le pool d'acides aminés libres des pucerons présente un profil équilibré et remarquablement constant. Le rôle des symbiotes intracellulaires dans cette homéostasie a été étudié à l'aide de pucerons aposymbiotiques. D'après ces résultats, le glutamate serait le seul acide aminé fourni par l'insecte à ses bactéries symbiotiques. Il servirait à la synthèse des acides aminés essentiels, ceux-ci seraient ensuite utilisés par le puceron (Liadouze Isabelle, 1995).

Il a ainsi été montré que des pucerons aposymbiotiques (c'est-à-dire privés de leurs bactéries symbiotiques) nourris sur aliment déséquilibré conservent un profil d'acides aminés libres déséquilibré, contrairement aux pucerons symbiotiques qui sont capables de reconstituer un profil "normal". La déplétion d'un ou plusieurs acides aminés dans le milieu nutritif du puceron hôte peut donc induire une vague de régulation chez *Buchnera* qui aboutit à la production de ces acides aminés. Aujourd'hui, l'utilisation des puces à ADN offre la possibilité d'explorer globalement l'ensemble des réponses métaboliques et régulatrices de cet organisme d'autant plus que le modèle de symbiose puceron/Buchnera est parfaitement adapté à la mise en œuvre de la technologie des puces à ADN. La symbiose est maintenant considérée comme une force d'entrainement dans la diversification et l'évolution des insectes (GY Bonnot, 1997).

3.1.4. Etat des lieux du rôle des symbiontes de pucerons :

Presque tous les pucerons possèdent la bactérie primaire : *Buchnera aphidicola* dans le cytoplasme des bactériocytes primaires localisés dans l'abdomen de l'insecte. Parce que *buchnera* fournit à son hôte les acides aminés essentiels et d'autres nutriments (Douglas, 1998), les pucerons souffrent d'un retard de croissance ou meurent quand on les prive de la symbionte (Houk et Griffiths, 1980). C'est pourquoi, il est largement accepté que les pucerons et leur endosymbionte *Buchnera* sont des partenaires mutualistiquement inséparables (Ryuichi Koga et al., 2003).

Symbiontes primaires et secondaires : races de pucerons d'*A pisum* :

Les pucerons entretiennent, une symbiose avec la bactérie *Buchnera aphidicola* (Buchner ,1965; Munson et al., 1991 ; Moran et Baumann 1994 ; Baumann et al., 1995). Cette symbiose est considérée, comme obligatoire car les pucerons privés de la bactérie deviennent stériles ou meurent (Houk et Griffiths ,1980; Ishikawa et Yamaji, 1985 ; Ohtaka et Ishikawa, 1991), tandis que *Buchnera* ne peut pas se développer à l'extérieur du puceron (Baumann et

Moran 1997). Le puceron apporte à la bactérie une niche stable et des nutriments, tandis que le symbionte, localisé dans le cytoplasme de cellules hypertrophiées spécialisées dans la symbiose, les mycétocytes (ou bactériocytes), synthétise des acides aminés essentiels et des nutriments (Baumann et al., 1995; Dixon 1998; Douglas 1998; Moran et Baumann 2000). Le symbionte est transmis maternellement de manière strictement verticale (Clark et al., 2000 ; Funk et al., 2000). L'origine évolutive de la symbiose avec *Buchnera* est considérée comme très ancienne (aux alentours de 150 millions d'années) et unique (Von Dohlen et Moran 2000). Certaines espèces de pucerons hébergent, en plus de *Buchnera*, des endosymbiontes "facultatifs" (ou "secondaires") qui ne sont pas systématiquement observés chez toutes les lignées d'une espèce et qui ne sont pas essentiels à la survie individuelle (Buchner 1965 ; Douglas 1989). Ces symbiotes facultatifs, ont été particulièrement étudiés chez le puceron du pois, chez lequel cinq endosymbiontes facultatifs différents ont été communément détectés (Chen et al. 1996; Chen & Purcell 1997; Fukatsu et al., 2000; Darby et al., 2001; Sandström et al. 2001; Tsuchida et al. 2002; Russell et al. 2003). Ce sont : *Serratia symbiotica* (PASS : pea aphid secondary symbiont ou R-type symbiont), *Regiella insecticola* (PAUS : pea aphid U-type symbiont ou U-type symbiont), *Hamiltonella defensa* (PABS : pea aphid *Bemisia* type symbiont ou T-type symbiont), *Rickettsia* symbiont (ou PAR, after pea aphid *Rickettsia*), et le symbionte *Spiroplasma* (Sandstrom, J. P. et al., 2001 ; Tsuchida, T. et al., 2002 ; Simon, J. C. et al., 2003). Les trois premiers symbiontes secondaires, sont localisés dans les mycétocytes, le type digestif et également dans l'hémolymphé de l'hôte (Fukatsu, T. et al., 2000 ; Koga, R. et al., 2003 ; Sandstrom, J. P. et al., 2001 ; Tsuchida, T. et al., 2005). *Serratia symbiotica* était fréquent chez les pucerons du pois et de la féverole, *Rickettsia* sp. présentait le même pattern que *S. symbiotica* mais sa prévalence était moindre, *Regiella insecticola* était spécifiquement associé aux pucerons du trèfle violet, *Spiroplasma* sp. était fréquent parmi les pucerons du trèfle violet et de la luzerne, *Hamiltonella defensa* était spécifiquement associé aux pucerons de la luzerne (Adrien FRANTZ, 2005).

Le rôle écologique de ces symbiontes demeure encore obscur. Du fait de leur forte prévalence au sein des espèces de puceron et de leurs effets significatifs sur le fitness de l'hôte dans une grande variété de contextes écologiques et environnementaux, les symbiontes facultatifs jouent vraisemblablement un rôle important dans l'écologie et l'évolution des pucerons (Russell et al., 2003). Leur localisation dans le corps du puceron est plus lâche que *Buchnera* et semble inclure l'hémolymphé. Il a été montré pour certains de ces symbiotes peuvent avoir des effets positifs ou négatifs sur des traits majeurs du puceron comme l'utilisation de la plante, la tolérance aux fortes températures, et la résistance aux ennemis naturels (Chen et al.,

2000; Wilkinson et al., 2001; Douglas et al. 2002; Montllor et al. 2002; Haynes et al. 2003; Ferrari et al. 2004; Tsuchida et al., 2004; Oliver et al., 2005).

Certains pourraient même compenser l'absence de *Buchnera* (Koga et al. 2003). Plus particulièrement, l'un de ces symbiontes semble associé à une mortalité accrue des pucerons sur la luzerne et une reproduction améliorée sur le trèfle (Leonardo et Muiru ,2003; Leonardo, 2004b) et l'hypothèse a été confirmée par la suite par des expériences d'injection et d'élimination sélective de ce symbionte (Tsuchida et al., 2004). De plus, il a été détecté en fortes proportions sur le trèfle dans des zones géographiques réparties autour du globe (Tsuchida et al., 2002; Leonardo & Muiru ,2003; Simon et al. 2003; Ferrari et al. 2004), apportant ainsi un élément supplémentaire dans l'hypothèse de l'implication de ce symbionte dans l'exploitation du trèfle (Tsuchida et al. 2004). D'une manière similaire, les autres symbiontes facultatifs communément hébergés par l'espèce pourraient être impliqués dans la spécialisation du puceron à la plante hôte, comme le suggèrent leurs prévalences différentes selon la plante d'origine observées dans différentes régions du globe (Tsuchida et al. 2002 ; Darby et al., 2003 ; Leonardo et Muiru, 2003; Simon et al., 2003; Ferrari et al., 2004). Cependant, les associations entre un type de symbionte et une plante hôte particulière ne sont pas systématiquement cohérentes entre ces différentes études.

3.1.5. Traitements antibiotiques :

De nouvelles techniques ont été développées pour éliminer de façon sélective des endosymbiontes avec des antibiotiques. Ainsi pour éliminer le PASS ou *Buchnera*, sélectivement, des adultes de pucerons sont traités avec des antibiotiques comme la rifampicine ou l'ampicilin, en utilisant une technique de micro injection. Les doses de rifampicine ou d'ampicilline sont de 1 μ g/mg et 20 ng/mg par poids corporelle respectivement. Les nymphes sont récupérées 24 à 48 après le traitement antibiotique des pucerons. Le diagnostic est fait par PCR pour confirmer ou non l'élimination des symbiontes (Ryuichi et al., 2003).D'autres traitements, des pucerons consistaient à élevés ceux-ci sur un système de diète artificielle qui incluent divers antibiotiques pour les rendre aposymbiotiques.

3.1.6 Extraction des symbiontes :

Différents protocoles expérimentaux sont proposés avec toujours le même schéma de principe :

Nous citerons ici le protocole élaboré par Heddli et al. (1991) : les pucerons sont broyés dans un tampon physiologique [NaCl 200 mM ; KCl 20mM ;CaCl₂ 3,5mM ; NaHCO₃ 2,5mM ; NaH₂PO₄ 0,1mM ; glucose 5mM ; levulose 2mM ; maltose 40mM]. Le broyat est filtré sur mousseline et centrifigé pendant 5 minutes à 4°C. Le surnageant est alors déposé sur une solution de Percoll[saccharose 250mM ; polyéthylène glycol 6000(PEG) 0,5%(p/v) ; Ficoll 0,1%(p/v) ; Percoll 36%(v/v) dans un tampon physiologique], ensuite centrifugé à 12000xg pendant 15 minutes à 4°C. Le culot est prélevé et dilué dans le tampon physiologique. Les symbiontes sont finalement sédimené par centrifugation à 12000xg, 10 minutes à 4°C.

4. Etat des lieux des techniques d'analyses protéomiques :

Le terme protéome a été proposé pour la première fois en 1995 pour désigner « l'ensemble des produits fonctionnels exprimés par un génome » (Kahn, 1995). Rapidement, avec l'avancée des techniques dans ce domaine, cette définition a évolué : N.L Anderson et N.G Anderson introduisent le terme « proteomics » et définissent l'analyse protéomique par « l'utilisation de la quantification au niveau de la protéine comme mesure objective de l'expression génique caractérisant un processus biologique donné et comme un moyen de décodage des mécanismes contrôlant cette expression » (Anderson and Anderson, 1998). Le protéome d'une cellule ou d'un tissu désigne donc l'ensemble des protéines exprimées par cette cellule ou ce tissu, dans un état donné et à un instant précis. Si le génome d'une cellule est unique, la cellule possède en revanche une multitude de protéomes qui dépendent de son environnement, de son état, de son histoire.

Les raisons qui expliquent l'importance prise par l'analyse protéomique sont les suivantes :

- Les niveaux d'expression protéique ne sont pas le simple reflet des niveaux d'expression des ARN messagers. En effet, des études ont montré que, pour une population de gènes considérée comme relativement homogène en terme d'expression des ARN messagers et de demi-vie des protéines codées, des variations significatives du niveau d'expression des protéines peuvent être observées (Anderson et Seilhamer, 1997) ;(Gygi et al., 1999) ;
- Les protéines peuvent subir une série de modifications qui ne sont pas forcément identifiables à partir de la seule séquence de leurs gènes. Beaucoup de ces molécules ne parviennent à leur forme biologiquement active qu'à la suite d'une étape de maturation post-traductionnelle comme, par exemple, la glycosylation ou la phosphorylation.

- L'analyse protéomique est dynamique. En effet, un même génome peut conduire à différents protéomes selon les étapes du cycle cellulaire ou de la différenciation, de la réponse à des signaux biologiques ou physiques, de l'état physiopathologique. Lottspeich et *al.* illustrent parfaitement ces phénomènes en rapprochant les images d'une chenille d'un papillon (Lottspeich, 1999).

Ainsi l'analyse protéomique se propose de donner une image globale de ces systèmes biologiques et de leur complexité. Mais le développement n'aurait pas été possible sans les avancées technologiques qui permettent l'étude du protéome telles que :

- Le séquençage de génomes complets qui alimentent les banques de données
- L'évolution des techniques de séparation des protéines et de préparation de l'échantillon avec les gels d'électrophorèse (1D ou 2D), l'apparition de systèmes de micro et nano-chromatographie liquide et leur couplage avec la spectrométrie de masse
- Le développement des spectromètres de masse en termes de sensibilité, de précision et de résolution ainsi que l'apparition de nouvelles générations d'instruments (MALDI-TOF-TOF,...)
- Des outils bioinformatiques de plus en plus performants et puissants.

Cette partie fait le point sur les récents développements dans le domaine de l'analyse protéomique.

4.1. Le gel d'électrophorèse bidimensionnel

Principe du gel 2D PAGE

Les travaux de O' Farrell en 1975 (O' Farrell, 1975) ont conduit à la mise au point d'une technique aujourd'hui au cœur de l'analyse protéomique : l'électrophorèse bidimensionnelle sur gel de polyacrylamide ou 2D-PAGE. Cette technique permet de séparer successivement les protéines d'un mélange complexe selon deux propriétés distinctes : leur point isoélectrique (pI) et leur masse moléculaire (figure 5).

Dans un premier temps, les protéines sont soumises à une électrophorèse dans un gel comprenant des ampholytes avec un gradient de pH connu. Au cours de cette étape, nommée

focalisation isoélectrique (IEF), les protéines soumises à un champ électrique constant migrent dans le gel jusqu'à atteindre une valeur de pH égale à leur point isoélectrique pour laquelle la charge globale de la protéine est nulle. Ensuite, une deuxième séparation orientée perpendiculairement à l'IEF est réalisée dans un gel réticulé constitué de polyacrylamide en présence d'un agent chimique dénaturant, le sodium dodécyl sulfate (SDS). La réticulation du gel permet de séparer les molécules suivant leur taille. Le SDS interagit avec les protéines et élimine l'influence de leur charge pour la séparation selon la seconde dimension (en les « tapissant » de charges négatives). Dès lors, les protéines sont séparées en fonction de leur masse (Arnaud, 2007).

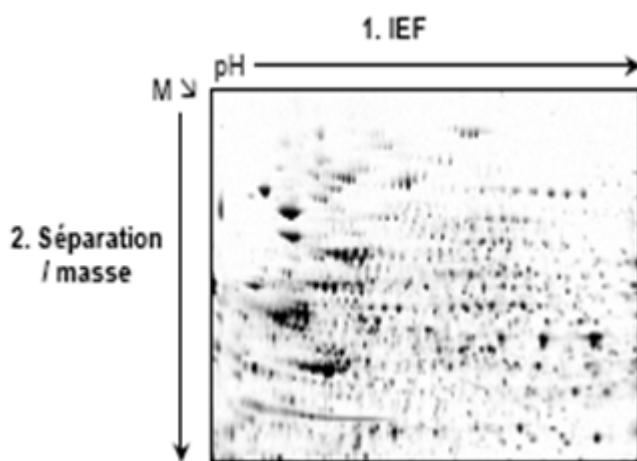


Figure 5 : Schéma de principe et photo (d'après Arnaud, 2007) d'un gel 2D-PAGE.

4.2. La coloration des gels 2D

Le choix du colorant permettant de révéler les protéines sur le gel conditionne la sensibilité de la technique. Parmi les colorants les plus fréquemment utilisés on distingue :

- Le bleu de Coomassie pour lequel l'intensité de la coloration est proportionnelle à la quantité d'échantillon sur une gamme de 10 à 200 ng /mm² (Radola et al., 1997) ;
- La coloration à l'argent, plus sensible et linéaire pour des concentrations de 0,04 à 2 ng / mm², dont l'intensité peut dépendre des propriétés intrinsèques de la protéine (Giometti et al., 1991) et par conséquent de ne pas refléter correctement la quantité de protéines de natures différentes en présence ;

- La coloration fluorescente comme le Sypro, le ruthénium (Rabilloud et al., 2001). Elle présente les avantages d'être à la fois sensible (0.2 à 200 ng/mm²), rapide à mettre en œuvre et également de ne pas fixer les protéines au gel, ce qui facilite leur extraction et permet, éventuellement, leur transfert sur membrane.

Par ailleurs, le choix de la coloration conditionne les résultats obtenus lors de l'analyse des taches (spots) protéiques par spectrométrie de masse.

4.3. L'analyse des gels

La première étape de l'analyse est la numérisation des gels, c'est-à-dire la transformation de l'image expérimentale en une information numérique utilisable par ordinateur. Plusieurs types d'instruments permettent de réaliser cette acquisition : scanners, caméras, densitomètres. Ils reproduisent l'intensité, la taille et la position des spots protéiques. Divers logiciels (ex. : PDQuest, Biorad, MELANIE, Proteomics Solutions) permettent ensuite de traiter les images obtenues.

Dans le cadre de l'analyse protéomique, les informations pertinentes sont alors issues d'analyses différentielles obtenues par comparaison des gels entre eux (Arnaud, 2007).

4.4. Améliorations de la technique

La technique des gels 2D a été considérablement améliorée ces dernières années. Parmi les récents progrès apparus dans ce domaine, on peut citer :

- L'apparition des gradients immobilisés de pH (IPG) (Bjellqvist et al., 1982) qui permettent d'une part, de stabiliser le gradient pH et donc d'augmenter la reproductibilité des gels et, d'autre part d'augmenter la capacité de chargement des gels (quelques mg de protéines) (Bjellqvist et al., 1993).
- L'apparition de nouvelles techniques de préparation de l'échantillon qui permettent d'améliorer la solubilisation des protéines afin de faciliter leur pénétration dans le gel avec l'incorporation d'agents de solubilisation, de surfactants, de détergents tels que la thiourée, le CHAPS (Rabilloud, 1996, Rabilloud et al., 1997).

- L'apparition de « zoom gels » (Westbrook et al., 2001), c'est-à-dire des gels avec un gradient de pH restreint, offrant une plus grande résolution et permettant de s'intéresser à des protéines présentes en faible quantité dans une zone de pH réduite.
- L'amélioration de la séparation des protéines basiques par blocage des cystéines avec différents agents alkylants (Luche et al., 2003).

Malgré ces améliorations, la technique des gels 2D présente une capacité à séparer les protéines encore limitée : le plus souvent les spots colorés ne correspondent pas à une seule protéine. De plus cette technique reste encore trop sélective (Rabilloud et al., 2001). Par exemple, les protéines membranaires (hydrophobes), d'intérêt thérapeutique, sont difficiles à solubiliser (Santoni et al., 2000).

Ainsi dans ce contexte, des stratégies alternatives de séparation des protéines sont envisagées pour pallier à ces diverses limitations.

4.5. Chromatographie liquide (nano-LC)

En protéomique, la chromatographie liquide a pour objectif de concentrer et de séparer un mélange plus ou moins complexe de peptides. Plus le volume dans lequel est éluée la molécule est petit, plus la concentration sera importante et meilleure sera l'intensité du signal. En effet, la réponse est proportionnelle à la concentration et non au débit. Le développement de la chromatographie nano-LC a 2 objectifs :

- Améliorer la limite de détection afin de pouvoir travailler avec des quantités de plus en plus faibles de matériel.
- Rendre les nano-colonnes et la nano-LC compatibles avec les sources « nano-electrospray ».

De ce fait, de grandes avancées techniques ont été réalisées au niveau des nano-colonnes (techniques de remplissage, nouvelles particules plus fines...) et au niveau de la chromatographie (nano-débits). Ainsi, du fait de la bonne performance de ce couplage nanoLC-MS ou nanoLC-MS/MS, cette approche est devenue complémentaire, voir même alternative à l'approche par gel 2D. Son avantage majeur reste sa sensibilité. En effet, la diminution du débit (200 nL/min) ne modifiant pas la concentration de l'échantillon, le temps d'analyse peut être augmentée, permettant l'obtention d'informations de séquences de bonne

qualité, sur de faibles quantités de matériel. De plus cette approche est assez aisément automatisable. Cependant, elle ne peut pas être utilisée seule, sans autre technique de séparation en amont, si l'échantillon est trop complexe. En effet, un extrait protéique contient plusieurs milliers de protéines d'où des centaines de milliers de peptides tryptiques qui ne pourront pas être séparés efficacement sur nano-colonnes.

4.6. Approches alternatives au gel 2D

Gel SDS PAGE couplé à la nano-LC

L'électrophorèse bidimensionnelle ne permettant pas l'accès à certaines protéines, une technique alternative consistant au couplage gel SDS PAGE suivie d'une séparation par nanoLC-MS/MS a été développée. Le gel SDS permet de séparer les protéines en fonction de leurs masses apparentes quelles que soient leurs caractéristiques physico-chimiques. Ainsi, il est possible de disposer de protéines basiques, hydrophobes auxquelles nous n'avions pas accès avec les gels 2D. Cependant, le pouvoir séparateur de cette technique reste faible, c'est pourquoi elle est suivie par une séparation par nano-LC sur nano-colonne de phase inverse. Dans cette approche, la séparation est réalisée d'une part sur les protéines (gel SDS) et sur les peptides (nano-LC) alors que dans l'approche gel 2D, les 2 séparations (1^{ère} 2^{ème} dimension) sont réalisées sur les protéines (Rabilloud, 2002).

La chromatographie multidimensionnelle

Pour contourner les limitations du gel 2D, telles que la capacité limitée de chargement, la difficulté de faire migrer des protéines hydrophobes ou la détection de protéines minoritaires, une nouvelle technique alternative a été envisagée : la chromatographie multidimensionnelle (Link et al., 1999, Yates, 2000).

Les peptides sont séparés par une colonne échangeuse de cations (les peptides étant majoritairement chargés positivement à pH acide) suivie d'une séparation sur colonne de phase inverse. Ainsi, la combinaison de plusieurs étapes chromatographiques permet de séparer avec une résolution satisfaisante des mélanges protéiques complexes. La chromatographie 2D-LC-MS/MS présente de plus l'avantage d'être complètement automatisable.

La combinaison de plusieurs méthodes chromatographiques permet de séparer les peptides protéolytiques selon différentes propriétés :

- Les colonnes échangeuses de cations ou d'anions permettent de séparer les peptides respectivement basiques ou acides,
- Les colonnes de phases inverses (C18) permettent une séparation selon l'hydrophobicité,
- Certaines colonnes d'affinité sont destinées à isoler une classe de peptides, contenant, par exemple, une histidine ou porteurs de phosphorylation.

Parmi les différentes combinaisons possibles, le couplage associant une colonne d'échange d'ions et une colonne de phase inverse est le plus fréquemment rencontré.

La technique décrite par Link (Link et al., 1999), dénommée DALPC (Direct Analysis of Protein Complex using mass spectrometry) repose sur l'utilisation de colonnes contenant successivement ces deux types de phases. Les peptides sont élus de la phase échangeuse d'ions par paliers correspondant à des injections de solvant aqueux contenant des concentrations croissantes de sels volatils (par exemple acétate d'ammonium). A chacun de ces paliers est associée une étape de fractionnement sur la phase inverse à l'aide d'un gradient de solvant organique. Les peptides élus sont directement analysés par spectrométrie de masse.

Cette technique reprise par Washburn et al. sous le nom de MudPIT (Multidimensional Protein Identification Technology) s'est avérée particulièrement puissante pour l'analyse du protéome de *Saccharomyces cerevisiae* : en 15 fractions de force ionique croissante, près de 1 484 protéines ont été détectées et identifiées, parmi lesquelles 131 étaient des protéines membranaires (Washburn et al., 2001).

Parallèlement à ce type de montage associant deux colonnes en série, il existe également des systèmes intercalant entre les deux types de phase une colonne supplémentaire dite de «de pré concentration» (Davis et al., 2001).

L'avantage d'un tel montage est d'éviter la présence, dans la source du spectromètre, de sels pouvant être nuisibles à la détection.

4.7. La quantification des protéines

Si les approches décrites précédemment permettent de séparer de façon efficace les protéines, elles ne permettent pas toujours de quantifier les protéines présentes dans le mélange analysé.

En effet, les étapes de digestion enzymatique et d'ionisation en spectrométrie de masse ne permettent pas d'obtenir facilement la quantité absolue de chaque protéine au sein d'un extrait cellulaire complexe. Si les problèmes de quantification par spectrométrie de masse sont évidents, de point de vue biologique il apparaît de plus en plus que les cellules modifient leur activité physiologique non pas en synthétisant de nouvelles protéines mais plutôt en modulant l'expression de leurs gènes, c'est-à-dire en augmentant ou en diminuant légèrement la synthèse de certaines protéines. Mais si la quantification relative peut être aisément réalisée par les gels 2D, il reste la limite liée à cette technique qui ne permet pas d'analyser toutes les protéines (protéines hydrophobes, de pI extrêmes ...) (Rabilloud et al., 2001). Or les méthodes de marquage décrites ici permettent d'éviter les limites rencontrées avec les gels 2D. En effet, si les échantillons sont immédiatement mélangés après le marquage, la digestion est uniforme pour les 2 échantillons. De même, puisque les peptides marqués sont censés co-écluer en HPLC, l'efficacité d'ionisation sera identique.

Ainsi, différentes approches de marquage des acides aminés ont été développées. Nous citerons 2 approches : la méthode ICAT (Isotope Coded Affinity Tag) et la méthode iTRAQ.

La technologie ICATL

L'approche ICAT, décrite dans la figure 6, permet de simplifier le mélange protéique en sélectionnant uniquement les peptides à cystéines marquées par chromatographie d'affinité, de les quantifier (Gygi et al., 1999, Gygi et al., 2000, Griffin et al., 2001) et d'identifier les protéines à partir des séquences peptidiques.

Dans le cadre d'une approche protéomique différentielle, les deux extraits cellulaires à comparer sont d'abord marqués avec un réactif : pour l'un le réactif est léger (d_0), pour l'autre le réactif contient du deutérium (d_8). Puis, les deux extraits sont mélangés et soumis à une hydrolyse enzymatique. Le marqueur utilisé possède à son extrémité un groupement biotine permettant ensuite la sélection spécifique des peptides contenant au moins une cystéine après le passage du mélange sur une colonne d'affinité (colonne avidine). La dernière étape consiste

à analyser le mélange peptidique par MALDI-MS ou par LC-MS/MS. Deux peptides « homologues » issus chacun d'un des deux extraits cellulaires analysés se distinguent par un écart de 8 Da. Ainsi, le calcul du ratio de l'intensité entre les deux formes permet la quantification relative des protéines présentes dans le mélange.

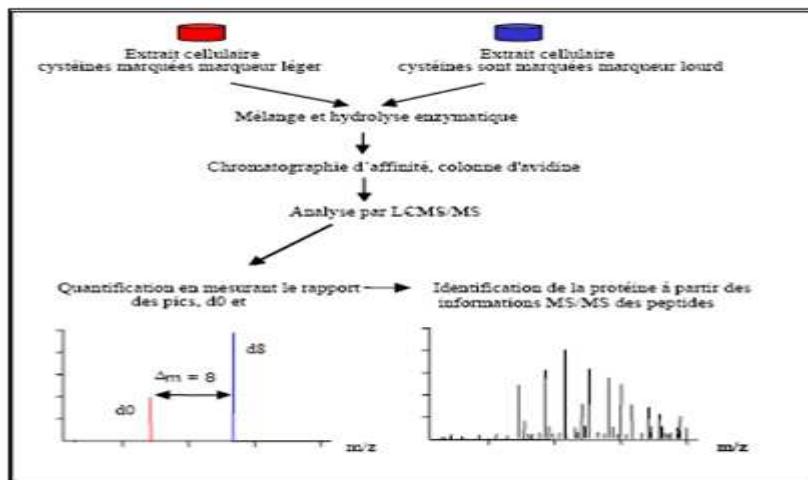


Figure 6 : Stratégie de marquage ICAT (Gygi et al., 1999)

Le principal avantage de cette technique est de s'affranchir de la complexité des extraits cellulaires puisque l'on ne conserve que les peptides comportant au moins une cystéine. Il est aussi possible de quantifier des protéines présentes en faible quantité. Cependant, cette approche ne semble pas compatible avec les échantillons complexes ; les peptides ne pourront pas être correctement séparés avant leur entrée dans le spectromètre de masse (pouvoir séparatif des nanocolonnes). De plus, de nombreuses pertes de peptides sont observées (adsorption des peptides sur les différentes colonnes...). De ce fait, l'acide aminé marqué étant rare pour simplifier le mélange, la perte d'un peptide peut signifier la perte de la protéine correspondante. De plus, certaines protéines ne possèdent pas de cystéines et échappent donc totalement à l'analyse. Enfin, lors de la séparation chromatographique, les paires de peptides lourds et légers ne sont pas co-elués, ils ont des temps de rétentions différents, empêchant toute analyse quantitative. Afin d'identifier l'ensemble des protéines dans le mélange tout en quantifiant, une alternative à cette approche a été développée : iTRAQ.

L'approche : iTRAQ

Ross et al. ont développé une nouvelle méthode de quantification qui utilise 4 acides aminés isobariques (Ross et al., 2004). Le principe consiste à fixer une séquence isobare en N-terminal et sur la chaîne latérale des lysines d'un mélange de peptides. Les différents

marqueurs ont des masses isotopiques différentes. Ainsi, lors du fractionnement en Tandem (MS/MS) chaque peptide ayant un TAG différent génère une fragmentation peptidique caractéristique du TAG greffé. La quantification protéique est alors réalisée en comparant les intensités des 4 ions rapporteurs dans le spectre de masse MS/MS. Le principal avantage de la technique iTRAQ par rapport à ICAT est que la capacité d'analyser 4 échantillons simultanément réduit le temps d'analyse par spectrométrie de masse.

5. La spectrométrie de masse et les études de protéome :

Si l'observation biologique reste la première étape de l'étude des relations plante –insectes, la compréhension des adaptations entre les différents protagonistes (y compris les bactéries symbiotiques des insectes) nécessite le développement d'approches moléculaires. A côté des outils génomiques fournissant de grandes quantités de données depuis de nombreuses années, la protéomique a été mise en œuvre plus récemment au vu des améliorations significatives et de la disponibilité plus importante de techniques de séparation et d'identification des protéines (FRANCIS Frédéric et *al.*, 2006). Pour ces raisons, les entomologistes moléculaires ont maintenant un panel d'outils pour déterminer les protéomes relatifs à des insectes sensibles ou adaptés à diverses situations de stress, notamment afin de faire face à des mécanismes de défense végétale. En effet, d'un point de vue biologique, les pucerons représentent un formidable modèle. Ils fournissent une diversité de sujets à investiguer : l'adaptation et les changements métaboliques des pucerons face à un transfert d'une espèce de plante hôte à une autre d'une autre famille botanique.

Associée à la séparation des protéines sur gel d'électrophorèse mono- ou bidimensionnelle, la spectrométrie de masse fournit une méthode performante pour identifier les protéines et leurs éventuelles modifications.

Dans une procédure devenue classique, les protéines sont séparées sur gel d'électrophorèse, digérées *in situ* par une enzyme séquence-spécifique (souvent la trypsine) ; le mélange des fragments protéolytiques, véritable empreinte peptidique de la protéine, est extrait du gel et analysé :

- soit par spectrométrie de masse MALDI, sans séparation supplémentaire du mélange de peptides : le spectre obtenu avec une précision de l'ordre de 50 ppm fournit l'empreinte peptidique massique de la protéine (PMF, « Peptide Mass Fingerprint »), qui va ensuite être comparée avec celles des protéines répertoriées dans une banque de données.

- soit par spectrométrie de masse en tandem ESI-MS/MS, souvent après une séparation des peptides par nano-chromatographie liquide. Les peptides sont élués de la colonne capillaire dans le spectromètre de masse. Ils sont mesurés individuellement par spectrométrie de masse en mode MS puis fragmentés en cellule de collision (MS/MS) pour obtenir des informations sur l'enchaînement en acides aminés du peptide.

Les données obtenues (masses de plusieurs peptides de la protéine complétées de morceaux de séquences de 5 à 10 résidus) sont confrontées aux banques de données pour identifier la protéine. Elles sont généralement plus discriminantes que les données obtenues en MALDI-MS.

La connaissance de la séquence de plusieurs peptides de la protéine laisse aussi la possibilité de l'identifier par homologie avec d'autres protéines de même fonction, lorsqu'elle n'est pas répertoriée dans les banques.

Le principe général de la spectrométrie de masse repose sur une ionisation du matériel protéique et au voyage (temps de vol) de ce matériel chargé vers un détecteur. On distingue plusieurs systèmes de spectrométrie de masse selon la technique d'ionisation et la technique de détection, mais nous ne nous limiterons qu'à quelques uns seulement.

Le MALDI-ToF (Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionisation-Time of Flight)

Cette approche permet l'établissement d'une carte peptidique massique (CPM), ainsi que l'identification de la protéine correspondante à condition qu'elle soit présente dans les banques de données. Une ou plusieurs protéines issues d'un gel monodimensionnel ou bidimensionnel après excision de bandes ou d'un spot d'intérêt peuvent ainsi être analysées. La protéine est digérée par une protéase spécifique (en général la trypsine), et les peptides qui en résultent sont mélangés à une matrice. Sous l'effet d'un laser UV (337 nm), la matrice irradiée subit une désorption entraînant une ionisation des peptides qu'elle contient par transfert de proton. Un temps de vol est alors mesuré pour chaque peptide qui est fonction de leurs masses mesurées par spectrométrie, ce qui constituera ainsi la carte peptidique massique de la protéine. Des logiciels identifient ensuite la protéine en comparant cette carte peptidique massique expérimentale aux cartes théoriques déduites des séquences en acides aminés des protéines recensées dans les banques de données (recherche BLAST : recherche de similitudes entre une séquence et une banque, site : <http://www.infobiogen.fr/>).

Séparation des protéines : l'électrophorèse est une méthode de séparation consistant en une migration de molécules chargées placées sous l'influence d'un champ électrique constant. Pour l'analyse des protéines, l'électrophorèse est généralement réalisée au travers d'un gel de polyacrylamide (PAGE, de l'anglais *PolyAcrylamide Gel Electrophoresis*) en présence de Sodium Dodécylique Sulfate (SDS), un détergent anionique qui défait la structure spatiale des protéines. De ce fait, toutes les protéines sont chargées de la même façon (charge négative), et la séparation dans le gel d'électrophorèse est alors uniquement fonction de la masse moléculaire de chacune des protéines. Pour dénaturer les protéines, on utilise à la fois un détergent comme le SDS et un agent réducteur, comme le bêta-mercaptopropanoïlique, qui réduit les ponts disulfures.

Mise en évidence des protéines

Le Western-blot

Cette technique consiste à transférer sur une membrane de nylon ou de nitrocellulose (on parle d'empreinte ou de transfert) différentes protéines contenues dans un gel SDS-PAGE dans lequel elles viennent de migrer, et de mettre ensuite en évidence sur cette membrane certaines protéines par une révélation de type antigène-anticorps couplé à un marqueur coloré. Cette étape de transfert a pour but de faire sortir les protéines du gel qui, sous l'impulsion d'un champ électrique, vont venir s'adsorber à la surface de la membrane. Une des méthodes de transfert envisageables, dite de transfert "semi-sec" (par opposition au transfert "liquide"), consiste à prendre en "sandwich" le gel et la membrane entre des papiers absorbants imbibés d'un tampon qui assurent la conductivité du montage. L'utilisation de méthanol (contenu dans la solution de transfert) va "activer" le gel en enlevant le SDS des protéines et en augmentant par la suite la liaison des protéines à la membrane. On peut, juste après le transfert, colorer la membrane avec un colorant spécifique des protéines d'une façon générale, comme par exemple le rouge Ponceau. Cette opération va permettre de vérifier que les étapes d'électrophorèse et de transfert se sont correctement déroulées.

La meilleure méthode pour caractériser une protéine au milieu d'autres protéines est l'immuno-marquage. Cependant l'étape d'immuno-détection nécessite que tous les sites de fixation potentiels, sites non spécifiques, non utilisés de la membrane soient bloqués. On parle de saturation de la membrane des sites de liaisons aspécifiques, qui diminueront également le bruit de fond du résultat final. Cette opération est particulièrement importante car c'est elle qui

assure une partie de la spécificité de la technique. Elle se réalise soit en incubant la membrane dans une solution de SAB (Sérum Albumine Bovine) ou, ce qui est moins coûteux, dans une solution faite à base de lait en poudre demi-écrémé.

DEUXIEME PARTIE : MATERIELS ET METHODES

MODELES BIOLOGIQUES ET CONDITIONS EXPERIMENTALES

1. Conditions de culture et d'élevage des espèces étudiées

1.1. Conditions de culture des plantes :

Arabidopsis thaliana

Arabidopsis thaliana est une plante de la famille des Brassicacées (Crucifères) à laquelle appartiennent de nombreuses espèces cultivées utilisées dans l'alimentation (chou, navet, radis, raifort, moutarde etc.). C'est une plante herbacée de 10 à 15 cm de haut à l'état adulte. Elle est formée d'une rosette de feuilles de 2 à 5 cm de diamètre située au ras du sol dont se détachent une courte racine et un pédoncule floral portant une inflorescence. Chaque plant peut ainsi produire plusieurs milliers de graines à chaque génération. Si la lumière, la température et les autres facteurs de croissance ne sont pas limitant, le cycle se déroule en six à huit semaines.

A. thaliana a cinq paires de chromosomes. La longueur de l'ADN d'une cellule haploïde est estimée entre 60 et 100 millions de paires de bases (60 000 à 100 000 kpb), environ cent fois plus petite que celle de plantes cultivées comme l'orge et le maïs. Plusieurs centaines de mutations sont connues et quelques unes d'entre elles sont aisément détectables à l'œil nu : couleur, poils, fleurs etc. (www.snv.jussieu.fr/bmedia/ATP/arabette.htm). *Arabidopsis thaliana* possède le plus petit génome connu et présente de nombreux avantages liés à sa facilité de culture en laboratoire, sa rapidité de développement et sa prolifilité. Aujourd'hui, l'ensemble du génome d'*A. thaliana* est séquencé : les gènes sont identifiés et localisés (<http://www.inra.fr/arabidopsisintro.html>).

Les graines d'*arabidopsis* sont semées sur un substrat composé de terreau et de la vermiculite (10 volumes et 2 volumes respectivement) placés dans des petits pots dont le fond est percé de petits trous. Les graines sont semées en raison de quatre par pot. . Pour maintenir le terreau humide, les pots sont placés dans 1 à 2 cm d'eau pendant 1 h chaque jour et placé sous une lampe lumineuse dans une enceinte maintenue à 22 - 25° C avec un éclairement permanent.

Fève (*Vicia faba*) :

Vicia faba L. appartient à l'embranchement des Spermatophytes, au sous-embranchement des Angiospermes, à la classe des Dicotylédones, à l'ordre des Fabales, à la famille des *Fabaceae* et à la sous-famille des *Faboideae*. Avec le pois et la lentille, la fève a constitué durant toute l'Antiquité une base alimentaire importante jusqu'au développement du haricot et de la pomme de terre. Cette espèce n'est plus prise en compte dans les statistiques agricoles (Hullé et al., 1999). Cette plante est facilement colonisée par *M. persicae* et constitue l'espèce végétale hôte utilisée au laboratoire pour les élevages de masse de *M. persicae*.

Les fèves des marais (*Vicia faba* L) sont cultivées dans des petits pots en polystyrène, sur un substrat composé d'un mélange de perlite et vermiculite (50 : 50), et abondamment arrosé tous les 2 jours. La pièce d'élevage est conditionnée à la température de 22±2 C°, et une photopériode de 16 heures.

1.2. Conditions d'élevage des pucerons

Les espèces de pucerons étudiées sont les suivantes :

- *Myzus persicae* sulzer (homoptera-Aphididae) (1776);
- *Acyrthosiphon pisum* Harris. (Homoptera : Aphidae).

Ces espèces de pucerons proviennent des élevages qui sont en cours depuis plusieurs années dans le laboratoire. Quelle que soit l'espèce, les conditions d'élevage (T°, HR, photopériode) sont identiques à celles décrites ci-dessus pour *V.faba*; L'inoculation des nouvelles plantes féveroies par ces espèces de pucerons se fait dès que celles-ci ont atteint une taille suffisante c'est-à-dire lorsque les fèves ont au moins 4-5 cm de hauteur. Ces différentes espèces sont élevées dans des locaux séparés pour limiter les contaminations.

Les espèces de pucerons utilisées lors des manipulations sont décrites dans le tableau 1

Tableau 1 : Caractères des différentes espèces de pucerons utilisées dans nos expériences

Caractères	Espèce 1	Espèce 2
Nom latin	<i>Myzus persicae</i> (Sulzer)	<i>Acyrtosiphon pisum</i> (Harris)
Nom vernaculaire	Puceron du pêcher	Puceron du pois
Taille	1,2 à 2,5 mm	2.2 à 3 mm
Couleur	Vert clair ou vert jaunâtre	Vert e
Hôte primaire	+50 de Familles dont :Brassicacee et fabaceae	Fabaceae
Hôte secondaire	Herbaceae	/
Dégâts	Transmission de viroses	Transmission de viroses

La majorité des espèces de pucerons sont monophages ou oligophages (Blackman et Eastop, 1994). Etant donné que ce travail traite de la relation entre le puceron et deux plantes appartenant à deux familles botaniques différentes, *Myzus persicae* Sulzer (1776) a été retenu au vu de son comportement alimentaire polyphage et *Acyrtosiphon pisum* pour son caractère monophage.

2. Etude de l'adaptation des pucerons : approche biologique

Les paramètres observés sont : le développement et la reproduction des pucerons qui consistent en l'observation du nombre de pucerons adultes survivants et du nombre de nymphes produits par ceux-ci.

Les pucerons (*Myzus persicae* et *Acyrtosiphon pisum*), élevés sur un système de diète artificielle (voir composition en annexe) incluant trois antibiotiques : la rifampicine, la chlorotétracycline et l'ampicilline.

2.1. Utilisation d'un système de diète artificielle incluant trois antibiotiques et évaluation des paramètres biologiques des pucerons asymbiotiques :

Pour produire des pucerons aposymbiotiques, les pucerons provenant de la fève sont élevés sur un système de diète artificielle contenant du Rifampicine, de la chlortétracycline et de l'Ampicilline à des concentrations de 10, 25, 50, 100 et 200 µg/ml.

Un petit cylindre en plastique est recouvert en son sommet par du parafilm. Sur ce parafilm, sont déposés 150µl d'une solution de diète artificielle. Le système de diète est composé d'une

solution de saccharose 15% w/v, elle-même recouverte d'un autre parafilm. Les pucerons sont placés dans le cylindre à raison de 20 individus par tube. Ils atteignent le premier parafilm et piquent à travers ce dernier pour prélever la diète incluant les antibiotiques. Les observations sur les performances biologiques des pucerons aposymbiotiques s'étendent sur trois jours.

Les concentrations finales d'antibiotiques utilisés sont les suivantes :

10 μ g/ml : 1,5 μ l d'antibiotique + 748,5 μ l de diète artificielle (solution de saccharose à 15%,

25 μ g/ml : 3,7 μ l d'antibiotiques + 746,3 μ l de diète

50 μ g/ml : 7,5 μ l d'antibiotiques + 742,5 μ l de diète ;

100 μ g/ml : 15 μ l d'antibiotiques + 735 μ l de diète ;

200 μ g/ml : 30 μ l d'antibiotiques + 720 μ l de diète ;

Témoin : 750 μ l de diète artificielle uniquement.

Chaque dose est répétée 5 fois. Les tubes sont alors placés sur un plateau rectangulaire puis mis dans l'incubateur à $\pm 20^{\circ}\text{C}$.

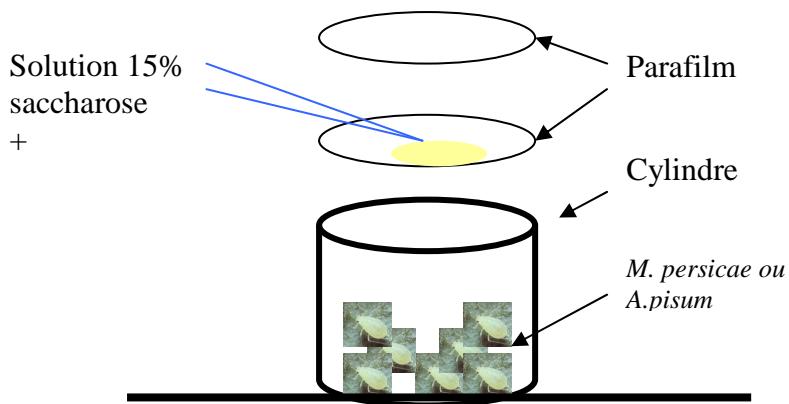


Figure 7 : Dispositif de diète artificielle incluant les antibiotiques

2.2. Evaluation des paramètres biologiques des pucerons aposymbiotiques :

Pendant 3 jours, on procède à l'évaluation de la mortalité et de la fécondité par le comptage du nombre d'adultes de pucerons survivants et du nombre de nymphes. Les pucerons élevés sur diète artificielle sont ensuite gardés à la fin de l'observation dans des tubes eppendorf à -80°C pour les analyses biochimiques.

2.3. Sélection d'une dose optimale d'antibiotique et comparaison des performances biologiques des pucerons symbiotiques et asymbiotiques :

Après comparaison de l'effet des trois antibiotiques sur les performances biologiques des pucerons, une dose optimale pour chacune des deux espèces de pucerons sera choisie ainsi

que les antibiotiques ayant donné les meilleurs résultats quand leur effet nôtoire sur le développement et la reproduction des pucerons testés.

2.4. Transfert des pucerons asymbiotiques sur deux plantes et évaluation des leurs performances biologiques :

- Observation des paramètres de développement et de reproduction de *Myzus persicae* (espèce généraliste) et *Acyrthosiphon pisum* (spécialiste des Fabaceae) sur deux espèces de plantes hôtes de deux familles botaniques (Brassicaceae et Fabaceae) différentes.
- Des adultes de *Myzus persicae* et d'*Acyrthosiphon pisum* sont élevés sur un système de diète artificielle incluant les deux antibiotiques efficaces (rifampicine et chlortétracycline) pendant trois jours afin de les rendre asymbiotiques. Ils sont ensuite transférés sur la fève (*vicia faba*) et l'*Arabidopsis thaliana* en raison de 3 adultes par plante en 8, 9 ou 10 répétitions.
- Sur *vicia faba* 3 adultes sont placés dans des << clips cage>> puis accrochés à la feuille de la plante de façon à ce que les pucerons puissent atteindre la face inférieure des feuilles. Seules les feuilles intermédiaires sont infestées par les pucerons, de préférence sur les jeunes feuilles.

Les observations sur les performances biologiques s'étendent sur une semaine. Chaque jour le nombre d'adultes survivants et de nombre de nymphes sont enregistrés dans le cahier de laboratoire. A la fin des observations les pucerons survivants et les nymphes sont mis dans des tubes eppendorfs et gardés au congélateur à – 80°C.

3. Etude de l'adaptation des pucerons : approche biochimique

3.1. Electrophorèse :

3.1.1. Electrophorèse monodimensionnelle :

3.1.1.1. Préparation des échantillons :

Extraction des symbiontes des pucerons :

2, 2 g de pucerons *Myzus persicae* et *Acyrthosiphon pisum* élevés sur diète artificielle incluant les antibiotiques (Rifampicine et Chlortétracycline) aux doses de 50 µg/ml pour *Myzus persicae* et 100 µg/ml pour *Acyrthosiphum pisum*, sont mis chacun dans un tube eppendorf auquel on ajoute 20 ml de solution de sucre et de 250 nM de EDATA KCL/TRIS PH8. Le tout est broyé avec un petit pilon. Puis 20 ml de solution sont ajoutés. A l'aide d'un filtre de 20µ le jus est récupéré et placer dans un centrifugeur pendant 10 minutes à la vitesse

de 15.000xg. Après le culot est récupéré auquel 40 ml de solution sont ajoutés et secoués et enfin filtré avec un tamis de 20 mm. L'échantillon est gardé dans le congélateur – 20°C pour une utilisation ultérieure.

Extraction des protéines :

2,5 g de *Myzus persicae* et *d'Acyrthosiphon pisum* sont mis chacun dans un tube eppendorf auquel on ajoute 100 μ l d'une solution de PB. Le tout est broyé à l'aide d'un petit pilon en plastique pour libérer les protéines. Notons que le travail se fait sur la glace afin de ne pas dénaturer les protéines. Les pucerons ainsi broyés sont mis dans un centrifugeur pendant 15 minutes à 4°C à 15000 g.

Le surnageant est recueilli à l'aide d'une pipette et mis dans un autre tube eppendorf. Ils sont ensuite conservés dans le congélateur jusqu'à leur utilisation ultérieure.

3.1.2. Quantification des protéines totales au spectrophotomètre :

Préparation des échantillons pour la quantification des protéines :

A 25 μ l d'échantillon (2 μ l de l'échantillon+ 23 μ l d'eau distillée) ou d'étalon, sont ajoutés 125 μ l de réactif I (RC-DCTM protein Assay). Le tout est vortexé et incubé 1 minute à température ambiante. Après cette durée, 125 μ l de réactif II sont ajoutés. Le mélange est vortexé et centrifugé à 15000 g pendant 5 minutes. Au culot sont ajoutés 127 μ l de réactif A'(A+ S : Bio-Rad DC Protein). Le précipité est vortexé, incubé 5 minutes à température ambiante et encore vortexé jusqu'à ce que le précipité soit dissout. Enfin, 1 ml de réactif B est ajouté et le tube est immédiatement vortexé. L'échantillon est incubé à température ambiante pendant 15 minutes.

La quantification est effectuée, au moyen du kit RC/DC Protein Assay (Bio-Rad) en utilisant comme étalon, des solutions de serum bovine albumine (BSA) avec des concentrations de 0,25 ; 0,375 ; 0,75 et 1,5 mg/ml.

Une droite d'étalonnage est dressée en mesurant la densité optique de 4 standards ayant une concentration en BSA de respectivement de 0,25 ; 0,375 ; 0,75 et 1,5 μ g/ μ l.

Chaque standard est placé dans une cupule en plastique de 1 ml qui est introduite dans un spectrophotomètre mono faisceau. L'absorbance de chaque solution est mesurée à une longueur d'onde de 750 nm.

La quantité de protéines de chaque échantillon est évaluée en mesurant la densité optique du mélange formé par 2 μ l de surnageant de l'échantillon et 1477 μ l de Bio-Rad Protein Assay

dilué 5 fois. Cette valeur est ensuite introduite dans l'équation de la droite d'étalonnage pour donner la concentration en protéines de l'échantillon.

3.1.3. Préparation des gels d'Acrylamide :

Préparation des gels d'Acrylamide :

La méthode PAGE est actuellement la méthode la plus utilisée en immunologie et en analyse des protéines, pour visualiser différentes protéines séparées en bandes distinctes en fonction de leur poids moléculaire.

La réaction de polymérisation se fait grâce à l'ajout de deux substances réactives : le "TEMED" et "l'ammonium persulfate"(APS) qui en réagissant avec la lumière deviennent des anions hyper réactifs enclenchant la polymérisation.

Des niveaux supérieurs de polymérisation aboutissent à une structure de gel plus dense, ce qui permet une meilleure séparation des protéines. Des niveaux plus bas minimisent la rétention des protéines, mais sont souvent requis pour séparer des protéines de poids moléculaires proches. Ces gels sont utilisés pour évaluer visuellement le poids moléculaire des protéines par rapport à celui de protéines connues.

Gels de séparation :

Le gel de séparation est fait à 12% pour 30 ml de solution mère. Sa composition est consignée dans le tableau ci-dessous :

Tableau 2 : Composition du gel de séparation pour électrophorèse mono-dimensionnelle

Composés	Volume
H2O distillée	9,9 ml
Acrylamide mix 30%	12 ml
1,5 M Tris PH8,8	7,5 ml
10% SDS	0,3 ml
10% APS	0,3 ml
TEMED	0,012 ml

Gel de concentration :

Un gel de concentration (stacking gel) (5%) est coulé en haut du gel de séparation pour permettre une entrée homogène de l'échantillon dans le gel de séparation. Des pistes individuelles sont réalisées par l'utilisation d'un "peigne" qui sépare le gel en portions égales destinées à la migration de chaque échantillon. La composition est la suivante :

Tableau 3 : Composition du gel de concentration pour électrophorèse mono-dimensionnelle

Composants	Volume
H2O	6,8 ml
Acrylamide mix 30%	1,7 ml
1,0 M TRIS (PH6, 8)	1,25 ml
10% SDS	0,1 ml
10% APS	0,1 ml
TEMED	0,01 ml

On charge les puits avec 30 µl de l'échantillon. Entre les échantillons est placé un marqueur de poids moléculaire (3 µl de marqueur pour 27 µl de bleu de Laemmli).

L'électrophorèse des protéines sur gel de polyacrylamide dénaturant en présence de sodium dodécyl sulfate(SDS) est employée pour séparer les protéines en fonction de leur poids moléculaire (Laemmli, 1970). Ce traitement au SDS 10% permet d'une part la dissociation des sous unités des protéines oligomériques, et d'autre part l'adsorption d'un grand nombre d'ions dodécyl sulfates chargés négativement sur tous les monomères. La mobilité électrophorétique de ces complexes protéines-SDS dépend donc uniquement du poids moléculaire des monomères qui sont déterminés par comparaison avec la mobilité des protéines étalons.

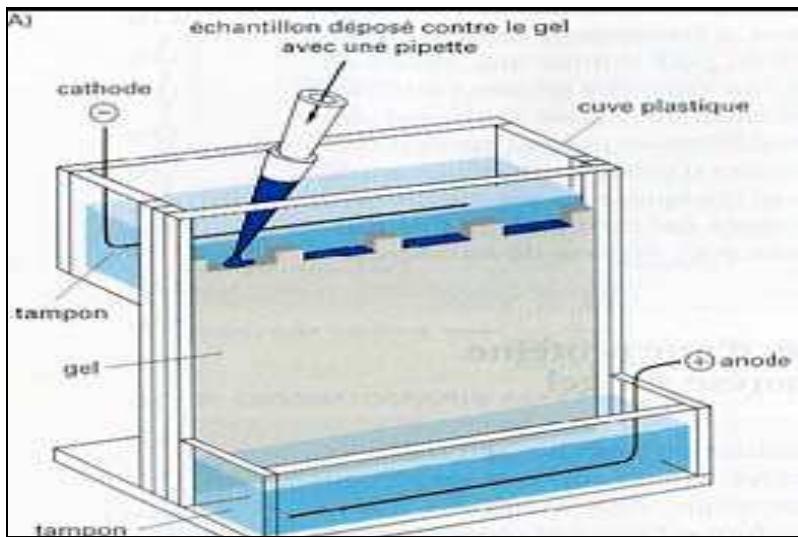


Figure 8 : dispositif gel 1D (François COURAUD, 2006)

Avant de couler les gels, on vérifie l'étanchéité des plaques avec de l'eau distillée (par la même occasion, on vérifie le volume de liquide nécessaire).

3.1.4. Condition d'électrophorèse :

Les gels sont montés dans un appareil à électrophorèse (Mini PROTEAN I, BioRad) et la cuve est remplie de tampon de cuivre (SDS10% dans les proportions (10 ml de SDS 10%, 14,4 g de glycine et 3 g de TRIS (tris HCL 25 nM).

L'électrophorèse est conduite à tension constante (200 V) pendant environ 3 heures, jusqu'à l'arrivée en bas du gel du front de migration visualisé par le bleu de bromophénol(Laemli).

3.1.5. Coloration des gels :

Les gels en fin de migration sont placés sous agitation lente après avoir été rincés dans de l'eau bi distillée 2 à 3 minutes pour ensuite passer à la fixation.

Coloration au bleu de Coomassie :

100 µl d'éthanol + 6µl d'acide phosphorique(H₃PO₄)

Fixation du gel : le gel est fixé au moins trois heures dans une solution composée de 50% d'éthanol, 3% d'acide phosphorique(H₃PO₄). Le gel est ensuite lavé 3 fois toutes les 20 minutes à l'eau distillée.

Après, il est pré incubé dans 34%(V/V) de méthanol, 3%(W/V) de H₃PO₄ et 17%(W/V) d'une solution de sulfate d'ammonium, en prenant soin de dissoudre d'abord le sulfate

d'ammonium dans l'eau distillée, puis ajout d'acide phosphorique et enfin on ajoute doucement le méthanol.

Coloration au nitrate d'argent :

Le gel est incubé dans une solution de fixation 40% v/v de méthanol, 10% v/v d'acide acétique pendant toute une nuit, la durée minimale étant d'1 heure. Le gel est ensuite lavé 2 fois 10 minutes avec de l'eau distillée et est mis en contact pendant 1 minute avec une solution de sensibilisation 0,02% w/v de thiosulfate de sodium, 6,80% w/v d'acétate de sodium, 20% v/v de méthanol, puis est rincé 2 fois 1 minute avec de l'eau distillée. Le gel est incubé 20 minutes à 4°C avec une solution d'imprégnation 0,10% w/v d' AgNO_3 , 0,04% v/v de formalin, pour ensuite être rincé 2 fois 1 minute avec de l'eau distillée. Après cette étape, quelques ml de solution de développement 0,04% v/v de formalin, 2% w/v de carbonate de sodium sont mis en contact avec le gel. Lorsque l'intensité de coloration désirée est atteinte, la solution de développement est éliminée et les gels sont lavés avec une solution 5% v/v d'acide acétique d'arrêt afin de stopper le développement de la coloration. Les gels sont stockés à 4°C dans une solution 5% v/v d'acide acétique, 12% v/v de méthanol.

3.2. Electrophorèse bidimensionnelle (IEF-SDS-PAGE) :

3.2.1. Lavage des protéines :

Le lavage est réalisé au moyen du kit 2D Clean-Up (Amersham Biosciences). A chaque échantillon de 1 μl sont ajoutés 300 μl de précipitant. Le tout est vortexé et incubé 15 minutes sur glace. 300 μl de Co-précipitant sont ensuite ajoutés à chaque échantillon. Le mélange est brièvement vortexé, puis centrifugé à au moins 12 000xg durant 5 minutes. Le surnageant est immédiatement éliminé. Le culot est centrifugé pendant 1 minute jusqu'à ce que le surnageant résiduel soit amené au fond de l'eppendorf. Le surnageant est éliminé avec le tips d'une micropipette. 40 μl de Co-précipitant sont ajoutés au-dessus du culot sans perturber ce dernier. Chaque eppendorf est incubé 5 minutes sur glace, puis centrifugé à au moins 12 000xg pendant 5 minutes. Le surnageant est éliminé et 50 μl d'eau distillée sont ajoutés au culot, le tout étant vortexé pendant 5 à 10 secondes pour disperser le culot. 1 ml de tampon de nettoyage (préalablement refroidi à -20°C pendant au moins 1 heure) et 5 μl d'additif de nettoyage sont ajoutés, le tout étant à nouveau vortexé pour disperser le culot. Chaque eppendorf est incubé à -20°C pendant au moins 30 minutes et vortexé 20-30 secondes toutes les 10 minutes, puis centrifugé pendant 5 minutes à au moins 12 000 g. Le surnageant est ensuite éliminé délicatement. Un culot blanc devient visible. Il est séché à l'air pas plus de 5

minutes, puis est remis en suspension dans 350 µl du tampon de réhydratation. Chaque eppendorf est vortexé au moins 30 secondes, puis incubé à température ambiante et à nouveau vortexé. Chaque eppendorf est centrifugé à au moins 12 000xg pendant 5 minutes pour éliminer les produits insolubles. Le surnageant doit être chargé directement pour la première dimension ou transféré dans un autre tube pour être stocké à -80°C jusqu'à analyse.

Le précipitant et le co-précipitant rendent les protéines insolubles. Le tampon de nettoyage élimine les contaminants non protéiques du précipité. L'additif de nettoyage favorise une resuspension rapide et complète des protéines de l'échantillon.

Le tampon de réhydratation est préparé de la manière suivante: 10 ml d'une solution 7M d'urée, 2M de thiourée, 5% w/v de résine mixed bed sont placés au moins 1 heure sur agitateur afin de dessaler l'urée et la thiourée, puis sont filtrés à l'aide d'une seringue et d'un filtre 0,22 micron. Le filtrat est récupéré et constitue une solution stock pouvant être stockée à -20°C. Le tampon est complété en ajoutant 2% w/v d'ASB 14, 0,025 M de DTT et 0,6-0,8% v/v d'ampholytes pH 3-11.

L'urée solubilise et dénature les protéines, les déplie pour exposer les acides aminés internes ionisables. La thiourée améliore la solubilisation des protéines. L'ASB 14 qui est un détergent de type alkylamidosulfobétaïne solubilise les protéines hydrophobes et minimise l'agrégation des protéines. Le DTT qui est un agent réducteur, coupe les ponts disulfides pour permettre aux protéines de se déplier complètement. Le mélange d'ampholytes améliore la séparation, particulièrement avec les échantillons fortement chargés. Les ampholytes augmentent la solubilité des protéines et produisent une conductivité plus uniforme à travers le gradient de pH sans déranger la première dimension. Le mélange d'ampholytes doit avoir un intervalle de pH identique à celui des strips utilisés. Le bleu de bromophénol permet de visualiser la migration de l'échantillon vers les électrodes et la progression de la première dimension.

3.2.2. Préparation des échantillons

A 25 µl d'échantillon (1µl de l'échantillon+ 24 µl d'eau distillée) ou d'étalon, sont ajoutés 125 µl de réactif I (RC-DCTM protein Assay). Le tout est vortexé et incubé 1 minute à température ambiante. Après cette durée, 125 µl de réactif II sont ajoutés. Le mélange est vortexé et centrifugé à 15000 g pendant 5 minutes. Au culot sont ajoutés 127 µl de réactif A'(A+ S : Bio-Rad DC Protein). Le précipité est vortexé, incubé 5 minutes à température

ambiante et encore vortexé jusqu'à ce que le précipité soit dissout. Enfin, 1 ml de réactif B est ajouté et le tube est immédiatement vortexé. L'absorbance est lue à 750 nm après une incubation à température ambiante de 15 minutes.

Après quantification des protéines au spectrophotomètre, les échantillons sont préparés de la façon suivante :

Pour 150 µg de protéines :

- 7,8 µl de l'échantillon *M. persicae* traité à la rifampicine + 342,2 µl de tampon ;
- 6,8 µl de l'échantillon de *M. persicae* traité à la chlortetracycline + 343,2 µl de tampon ;
- 13,1µl de l'échantillon de *M. persicae* témoin + 336,9 µl de tampon ;
- le mix1 composé d'un tiers de l'échantillon de *M. persicae* ;
- 7,9 ; de l'échantillon d'*A. pisum* traité à la rifampicine + 342,1 µl de tampon
- 11 µl ; de l'échantillon d'*A. pisum* traité à la chlortétracycline + 339 µl de tampon
- 13,4 µl ; de l'échantillon d'*A. pisum* témoin + 336,6 µl de tampon ;
- Le mix 2 composé d'un tiers de l'échantillon d'*A. pisum*

3.2.3. Isoélectrofocalisation :

La première dimension ou focalisation isoélectrique (IEF : isoelectric focusing) sépare les protéines en fonction de leur point isoélectrique (pI).

Des tampons Whatman imbibés d'eau sont placés sur les électrodes du plateau du Protean IEF Cell (Bio-Rad). Les 350 µl de tampon de réhydratation contenant les protéines de l'échantillon sont déposées sur toute la longueur de la rainure du plateau en évitant de tout déposer sur les tampons. Les Immobiline™ DryStrip pH 3-11 NL de 18 cm (Amersham Biosciences) stockés à -20°C jusqu'à utilisation sont sortis du congélateur. La languette de protection du strip est enlevée et le strip est déposé avec le côté gel contre l'échantillon en évitant la formation de bulles d'air. Le strip est ensuite recouvert d'1,5 ml d'huile minérale pour éviter évaporation de l'échantillon. Le couvercle de la cellule est refermé. Les tampons sont changés pendant la phase de dessalage et la focalisation pour éliminer des sels résiduels.

Le programme de voltage appliqué est le suivant ; sa durée totale est de 19h30 :

Phase	Voltage	Temps
Réhydratation active	250 V	9 h
Dessalage	50 V → 200 V	2 h en mode rapide
	200 V → 1000 V	4 h en mode linéaire
	1000 V → 10 000 V	1 h en mode linéaire
Focalisation	10 000 V	3 h 30

Tableau 4 : Programme de voltage appliqué pendant l'IEF

3.2.4. Deuxième dimension (SDS-PAGE) :

La deuxième dimension ou électrophorèse sur gel de SDS-polyacrylamide (SDS-PAGE : SDS-polyacrylamide gel electrophoresis,) sépare les protéines en fonction de leur masse moléculaire.

Après l'IEF, les strips sont plongés dans de l'eau distillée pour enlever l'huile en excès, puis épongés délicatement par leur côté plastique. Les strips sont ensuite transférés dans une burette contenant du tampon de réduction et agités pendant 12 minutes. Après cette durée, les strips sont transférés dans un pied gradué recouvert de papier aluminium contenant du tampon d'alkylation et agités pendant 15 minutes. Ces solutions d'équilibrage introduisent des réactifs essentiels pour la deuxième dimension.

Préparation des gels 2D :

Tableau 5 : Composition du gel 2D

Tampon de réduction	6 M d'urée, 375 mM de Tris, pH 8,8, 20% v/v de glycérol, 2% v/v de SDS, 130 mM de DTT
Tampon d'alkylation	6 M d'urée, 375 mM de Tris, pH 8,8, 20% v/v de glycérol, 2% v/v de SDS, 135 mM d'IAA

L'urée et le glycérol réduisent l'effet de l'électroendosmose en augmentant la viscosité du tampon. Ce phénomène est dû à la présence de charges fixées sur le strip dans le champ électrique et peut interférer avec le transfert des protéines du strip au gel de la seconde dimension. Le Tris-HCl (0,375 M ; pH 8,8) maintient le strip dans une gamme de pH appropriée pour l'électrophorèse. Le SDS dénature les protéines et forme avec ces dernières des complexes charges négativement. La quantité de SDS lié à une protéine, et donc la charge négative additionnelle, sont directement proportionnels à la masse de la protéine. Le DTT

garde les protéines sous forme réduite. L'IAA alkyle les groupes thiols des protéines, ce qui empêche leur ré-oxydation pendant l'électrophorèse. Cette ré-oxydation pendant l'électrophorèse peut causer une traînée et d'autres artefacts. L'IAA alkyle également le DTT résiduel pour empêcher les artefacts lors de la coloration des gels au nitrate d'argent.

La mise au point et les essais ont été réalisés en utilisant le Protean Plus Dodeca Cell qui permet d'en couler 12 gels simultanément.

Les gels constitués de 1,5 M en Tris-HCl, pH 8,8 ; 20% v/v de SDS ; 20% v/v d'une solution 43,65% d'Acrylamide-1,35% de Bisacrylamide ; 10% w/v d'APS ; 0,00125% de Temed sont coulés entre les plaques de verre. Une fois le gel polymérisé, le strip est déposé, puis stabilisé en contact avec le gel en versant une solution 25 mM de Tris, 122 mM de glycine, 0,1% w/v de SDS, 1% w/v d'agarose, colorée par du bleu de bromophénol et préalablement chauffée. Les plaques sont chargées dans la cuve qui est remplie de tampon 25 mM de Tris, 122 mM de glycine, 0,1% w/v de SDS.

Analyse des gels :

Les gels colorés au bleu de Coomassie et au nitrate d'argent sont scannés avec le Umax PowerLook 1120 (Amersham).

Le traitement informatique consiste à comparer le volume d'un même spot présent sur des gels appartenant à des classes différentes. Le volume tient compte du niveau de gris et du nombre de pixels couverts par le spot envisagé. Une classe regroupe un ensemble de 4 gels qui ont une même signification biologique ou des caractéristiques communes et qui représentent ainsi une même population. Dans le cas de l'analyse protéomique réalisée sur les protéines de *M. persicae* et *A. pisum* élevés sur diète artificielle contenant de la rifampicine ou de la chlortétracycline, 4 classes sont envisagées : pucerons nourris à la rifampicine, pucerons nourris à la chlortétracycline, puceron témoin, symbiontes et un mélange qui regroupe un tiers des protéines de chacune des quatre classes. La classe "mélange" n'est représentée que par un seul gel tandis que les autres classes sont chacune représentées par 4 gels. Vu que la classe "mélange" contient toutes les protéines des 4 autres classes, elle sert de classe de référence pendant toute l'analyse. Enfin, les valeurs sont normalisées par rapport à la classe "mélange".

TROISIEME PARTIE : RESULTATS ET DISCUSSION

1. Résultats:

Les données recueillies ont été traitées à l'aide du logiciel statistique Minitab (version 13.1 sous windows – MINITAB, 2001), en utilisant le test de simultanéité de Tukey.

1.1. Etude de l'adaptation des pucerons : approche biologique

1.1.1. Effet des antibiotiques sur le développement et la reproduction de *M. persicae* :

Evolution de la survie du *M. persicae* en fonction du temps et des antibiotiques

Il s'agit d'évaluer les paramètres biologiques du puceron *M. persicae* en fonction de trois types d'antibiotiques : la rifampicine, la chlortetracycline et l'ampicilline, au cours du temps et en fonction des différentes doses, avec observation toutes les 24 heures. Les résultats sont présentés dans le tableau 6 et à la figure 9. Par rapport aux antibiotiques l'analyse de la variance montre une différence hautement significative entre les effets sur la survie du puceron ($F_{2;486} = 5,32$; $P < 0,005$), un effet hautement significatif des niveaux de doses ($F_{5;486} = 3,62$; $P < 0,003$) et très hautement significatif en fonction des niveaux des jours ($F_{2;486} = 153,95$; $P < 0,001$). Cependant nous avons noté aucune corrélation entre jours, antibiotiques et doses ($F_{20;486} = 0,81$; $P = 0,700$) sur la survie de *M. persicae*. Par contre une interaction hautement significative a été révélée entre le type d'antibiotique utilisé et les doses, ce qui nous conduit à réaliser une analyse de variance à deux niveaux de variation en utilisant le test de simultanéité de Tukey.

Evolution de la survie du *M. persicae* en fonction des doses de chlortétracycline :(figure 9) Le modèle linéaire généralisé fait ressortir des différences hautement significatives entre les 5 doses du chlortétracycline ($F_{5;162} = 24,47$; $P < 0,001$) sur la survie du puceron. Cependant il ya une interaction significative entre le niveau des jours et l'effet des doses ($F_{10;162} = 2,10$; $P < 0,027$). Nous ferons alors l'analyse de la variance pour chaque facteur contrôlé.

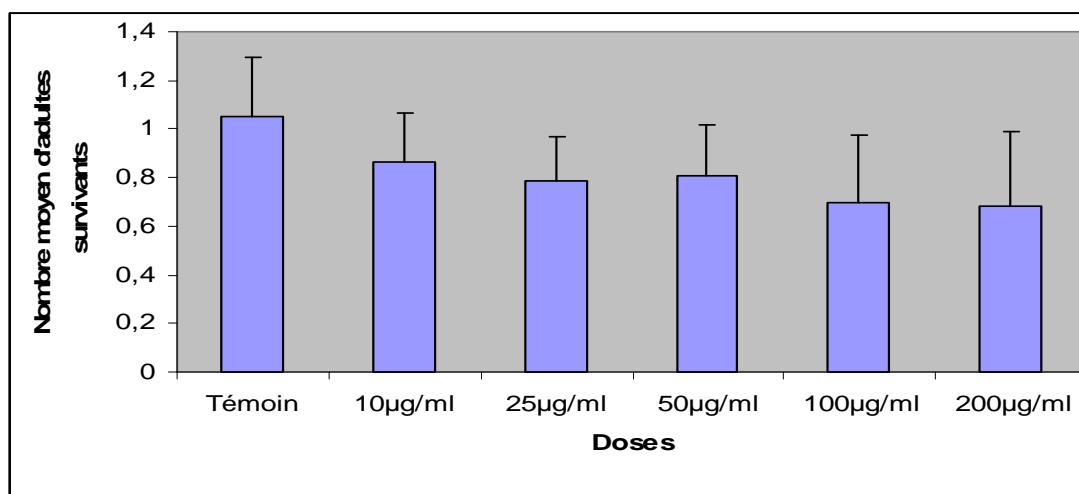


Figure 9 : Evolution de la survie de *M. persicae* en fonction de différentes doses de chlortétracycline. Nombre moyen d'adultes survivants \pm SD. Les barres représentent l'écart type, $P<0,001$.

Le nombre d'individus de *M. persicae* diminue significativement avec l'augmentation de la concentration de l'antibiotique. Une différence hautement significative est enregistrée entre les niveaux de doses ($F_{(5, 174)} = 9,71$; $P<0,001$). Les pucerons soumis à différentes doses réagissent donc différemment. Plus la concentration du chlortétracycline est élevée moins *M. persicae* survit.

La survie du puceron est beaucoup plus élevée au niveau du témoin sans antibiotique et les doses de 10 et 25 µg/ml. La plus faible moyenne est enregistrée pour les doses de 100 et 200 µg/ml (tableau 7).

Effet de la chlortétracycline sur la fécondité du *M. persicae* en fonction des doses :

L'analyse de variance de la fécondité de *M. persicae* montre une différence hautement significative entre le nombre de jours et les doses de chlorotétracycline ($F_{10, 162} = 4,99$; $P<0,001$).

Les résultats des paramètres de la fécondité de *M. persicae* en fonction du temps, montre qu'il y a une différence hautement significative entre d'une part les moyennes du nombre total de nymphes ayant émergés ($F_{2, 162} = 18,54$; $P<0,001$), et la moyenne des différents niveaux de doses ($F_{5, 162} = 35,30$; $P<0,001$) au niveau des différents traitements. Par ailleurs une corrélation hautement significative entre les niveaux de jours et ceux des doses nous amène à faire une analyse de variance pour chaque facteur.

On note ainsi une variation du nombre de nymphes produits par le puceron en fonction du temps ($F_{2, 177} = 8,36$; $P<0,001$).

La figure 10 montre une différence hautement significative de l'effet des différentes doses de chlortétracycline sur la fécondité de *M. persicae* ($F_{5;174} = 24,70$; $P < 0,001$).

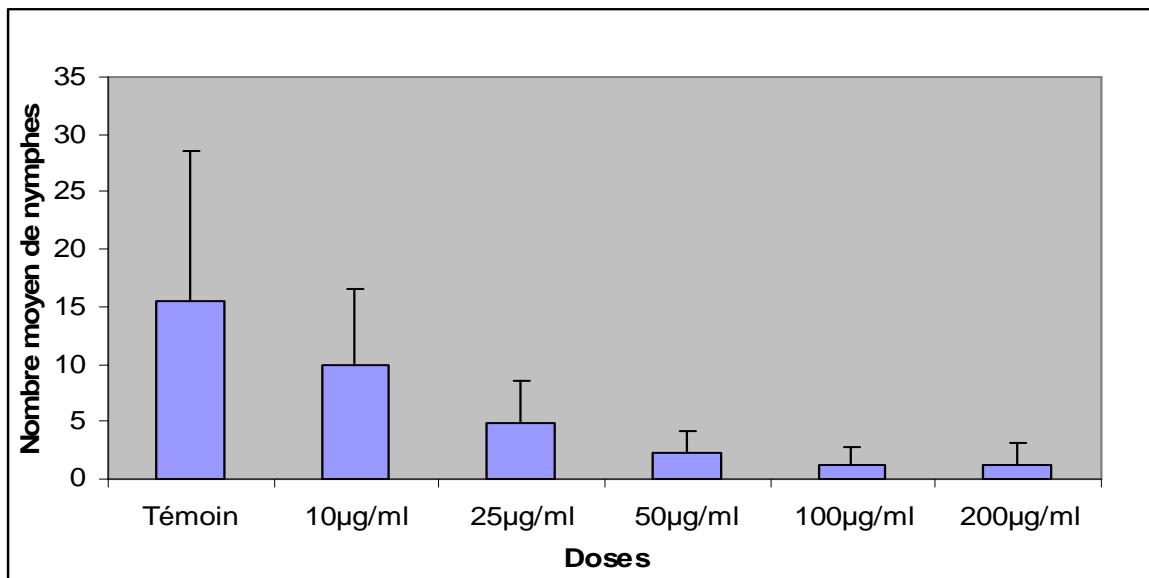


Figure 10 : Evolution de la fécondité de *M. persicae* en fonction des doses de chlortétracycline. Nombre moyen \pm SD. Test de Turkey.

L'évolution de la fécondité du *M. persicae* diffère en fonction des doses. Ainsi, les pucerons élevés sur les doses 50, 100 et 200 µg /ml ont enregistré la plus faible moyenne de nymphes émergeant, par rapport aux doses de 10 ; 25 µg/ml.

Toutes les doses de chlortétracycline sont significativement différentes du témoin. Par conséquent, elles peuvent être considérées comme ayant un effet potentiel sur le développement et la reproduction de *M. persicae*.

Ces résultats montrent qu'il ya une différence significative entre les moyennes d'émergence des nymphes de *M. persicae* sur le chlortétracycline. Le traitement : 10µg/ml avec une faible concentration en chlortétracycline enregistre en moyenne la plus forte émergence(9,7). La reproduction de *M. persicae* est réduite de moitié quand la dose est doublée. De façon générale, plus la dose de chlortétracycline est élevée, plus la fécondité de *M. persicae* est faible.

Effet de la rifampicine sur la survie de *M. persicae* en fonction des doses :

L'analyse générale montre des différences significatives entre les doses de rifampicine quand à leur effet sur *M. persicae* ($F_{5;162} = 2,79$; $P < 0,019$) et très significative pour l'évolution de la survie en fonction des jours ($F_{2;162} = 28,76$; $P < 0,001$). Cette évolution n'est pas statistiquement corrélé aux effets des différentes doses de rifampicine ($F_{10;162} = 0,28$;

$P<0,984$). Nous constatons une variation très significative de la survie du puceron au cours du temps, en même temps qu'un effet significatif des différentes doses sur *M. persicae*. Ainsi les doses 10 et 25 présentent statistiquement le même effet par rapport aux autres doses.(figure 11).

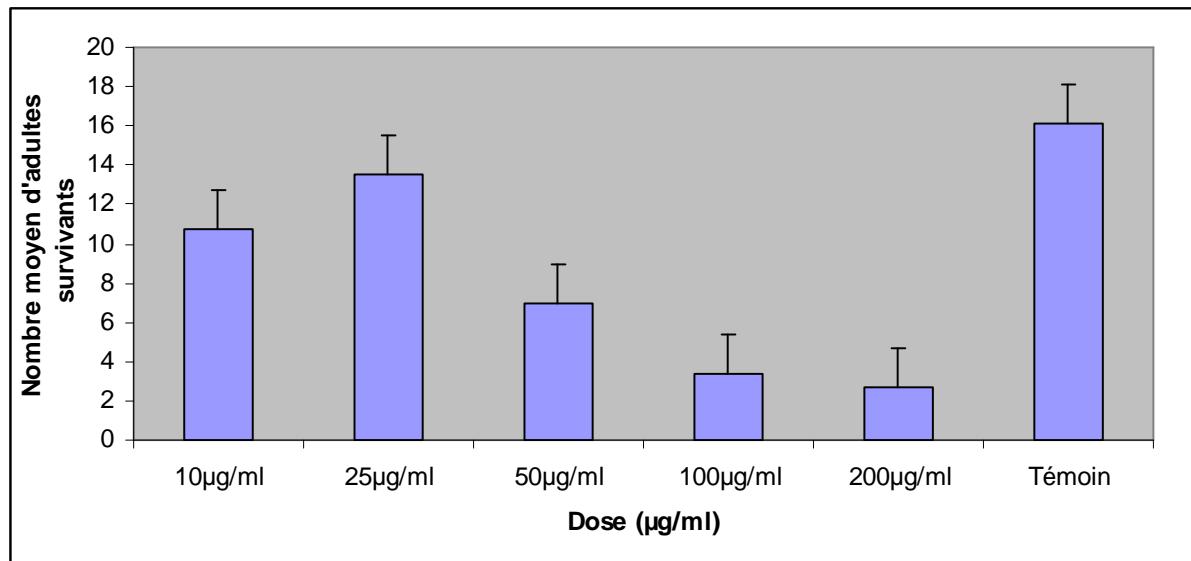


Figure 11 : Evolution de la survie de *M. persicae* en fonction des doses de rifampicine

Nous remarquons ainsi un effet très significatif des différentes doses sur la survie de *M. persicae*, se traduisant par une réduction notable des adultes soumis l'antibiotique.

Effet de la rifampicine sur la fécondité de *M. persicae* en fonction des doses :

Par rapport à l'effet des doses de rifampicine sur la reproduction de *M. persicae* aucune interaction significative n'a été révélée entre les doses et le temps ($F_{(10, 162)}= 0,70$; $P= 0,720$), on note cependant une différence très significative entre les effets des différentes doses (figure 12) sur le pouvoir fécondant du puceron ($F_{(5, 162)}= 3,90$; $P<0,002$).

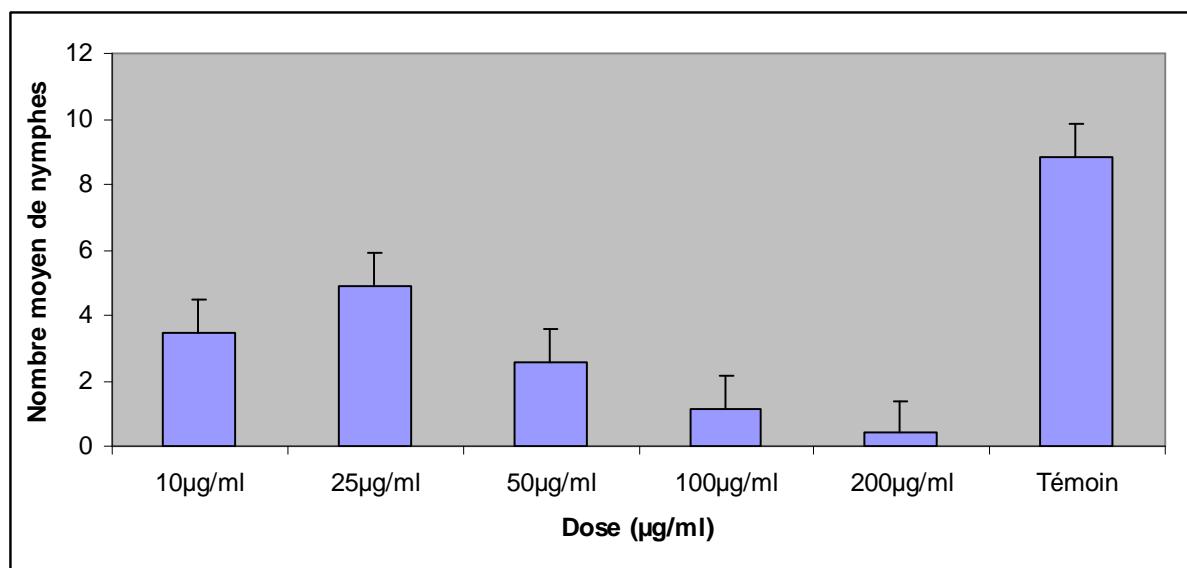


Figure 12 : Evolution de la fécondité de *M. persicae* en fonction des doses de rifampicine

Le nombre de nymphes de *M. persicae* varie en fonction des doses. La plus forte natalité est remarquée aux doses de 25 et 10 µg/ml, suivis par la concentration de 50µg/ml, et la moyenne plus faible à la dose de 200 µg/ml.

Effet de l'ampicilline sur la survie de *M. persicae* en fonction des doses :

L'analyse générale ne révèle aucune différence significative entre les effets des différentes concentrations de l'ampicilline ($P<0,93$) sur le développement de *M. persicae*. Le nombre d'adultes survivants varie très faiblement au cours du temps. Cependant, il n'y a pas de corrélation significative entre le nombre de jour et les doses d'antibiotique ($F_{(10,162)}= 0,90$; $P= 0,53$).

Toutes les doses d'ampicilline utilisée ne diffèrent pas statistiquement comparativement au témoin (figure 13).

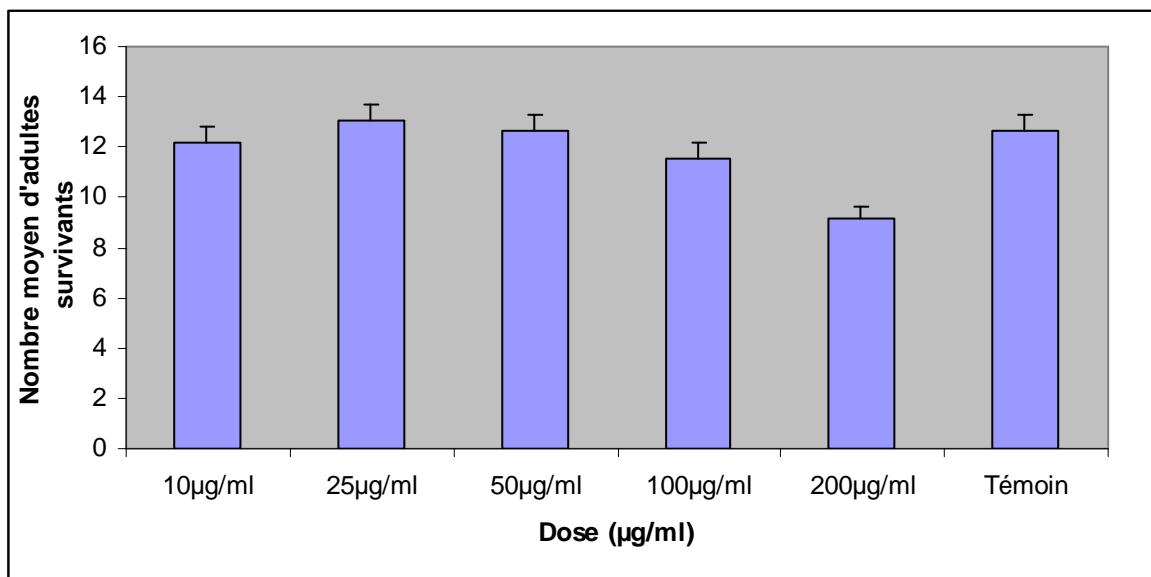


Figure 13 : Evolution de la survie de *M. persicae* en fonction des doses d'ampicilline

Effet de l'Ampicilline sur la fécondité de *M. persicae* en fonction du temps et des doses :
 Les différentes doses d'ampicilline prises dans leur globalité présentent des différences très significatives quant à leurs effets sur la reproduction de *M. persicae* ($F_{(5, 162)} = 11,19$; $P < 0,001$) en fonction du temps. La comparaison des niveaux de doses deux à deux montre qu'il ya une différence très significative entre les doses 1 et 2 ($P < 0,0002$). Par contre aucune différence importante n'a été enregistrée entre les doses 3,4 et 5. La figure 14 montre l'évolution de la fécondité de *M. persicae* en fonction des doses.

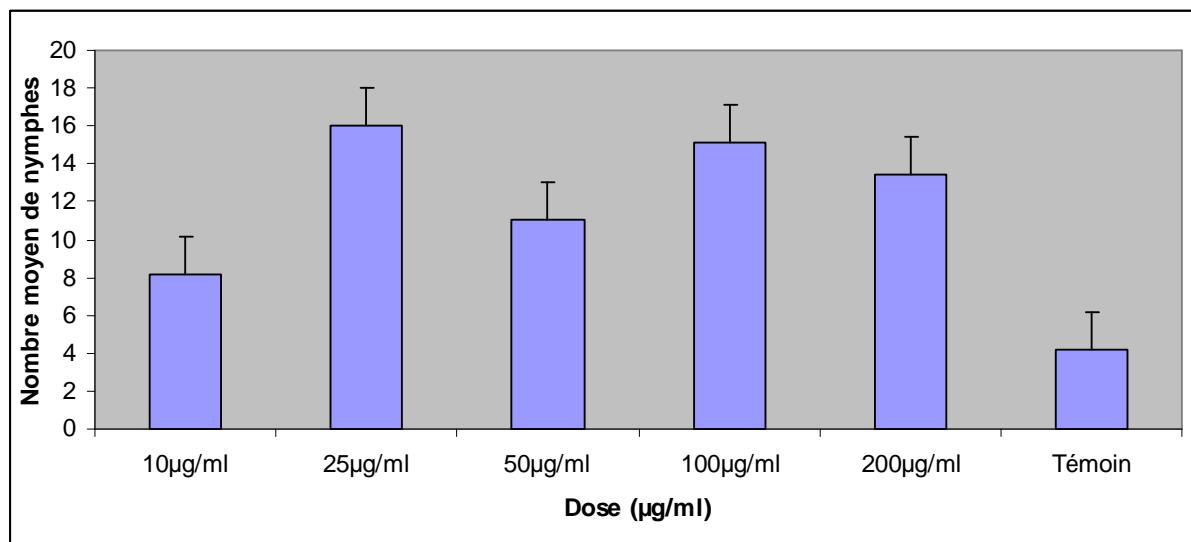


Figure 14 : Evolution de la fécondité de *M. persicae* en fonction des doses d'ampicilline

1.1.2. Effet des antibiotiques sur le développement et la reproduction d'*Acyrhosiphon pisum* :

Evolution de la survie d'*A. pisum* en fonction des doses d'antibiotiques :

Quant au puceron, *Acyrhosiphon pisum* élevé sur diète artificielle incluant les trois types d'antibiotiques (la rifampicine, le chlortétracycline et l'ampicilline), l'analyse générale fait ressortir : une différence hautement significative entre les effets des doses utilisées ($F_{(5, 216)} = 6,28$; $P < 0,001$), un effet très significatif des différents types d'antibiotiques ($F_{(2, 216)} = 53,93$; $P < 0,001$) sur la survie et le développement du puceron. Par contre il n'y a pas de corrélation significative entre les effets de doses et les antibiotypes ($F_{(10, 216)} = 0,92$; $P = 0,750$). Le nombre d'adultes survivants d'*A. pisum* varie de façon significative en fonction du temps ($P < 0,001$).

Le développement du puceron ne semble pas être affecté par les effets des doses car il n'y a pas eu de différence significative entre les effets des doses ($F_{(5, 252)} = 1,35$; $P = 0,243$), cependant l'analyse des antibiotiques révèlent une différence hautement significative quant à leur effet sur le puceron ($F_{(2, 252)} = 11,61$; $P < 0,001$). Les niveaux de doses comparées deux à deux ne sont pas statistiquement différents Quant aux antibiotiques, la rifampicine et la chlortétracycline ne dégagent pas de différence significative ($P = 1$) comparativement au témoin. Il n'y a pas de corrélation entre les doses et le type d'antibiotique ($F_{(10, 252)} = 0,20$; $P = 0,996$).

Evolution de la fécondité d'*Acyrhosiphon pisum* en fonction des doses d'antibiotiques :

L'analyse générale montre : une différence hautement significative entre les effets des doses ($F_{(5, 216)} = 13,57$; $P < 0,001$) sur la reproduction du puceron . Les effets entre les différents types d'antibiotiques présente également des différences très significatives ($F_{(2, 216)} = 6,32$; $P < 0,002$). Cependant, il n'y a pas de corrélation significative entre les doses et le type d'antibiotique ($F_{(10, 216)} = 1,02$; $P = 0,425$). La reproduction d'*A. pisum* varie significativement en fonction du temps. La rifampicine et la chlortétracycline présentent statistiquement le même effet sur le puceron ($P = 1$).

Les figures 15, 16 et 17 montrent respectivement l'évolution de la survie et de la fécondité d'*A. pisum* en fonction des doses de chlortétracycline, d'ampicilline et de rifampicine.

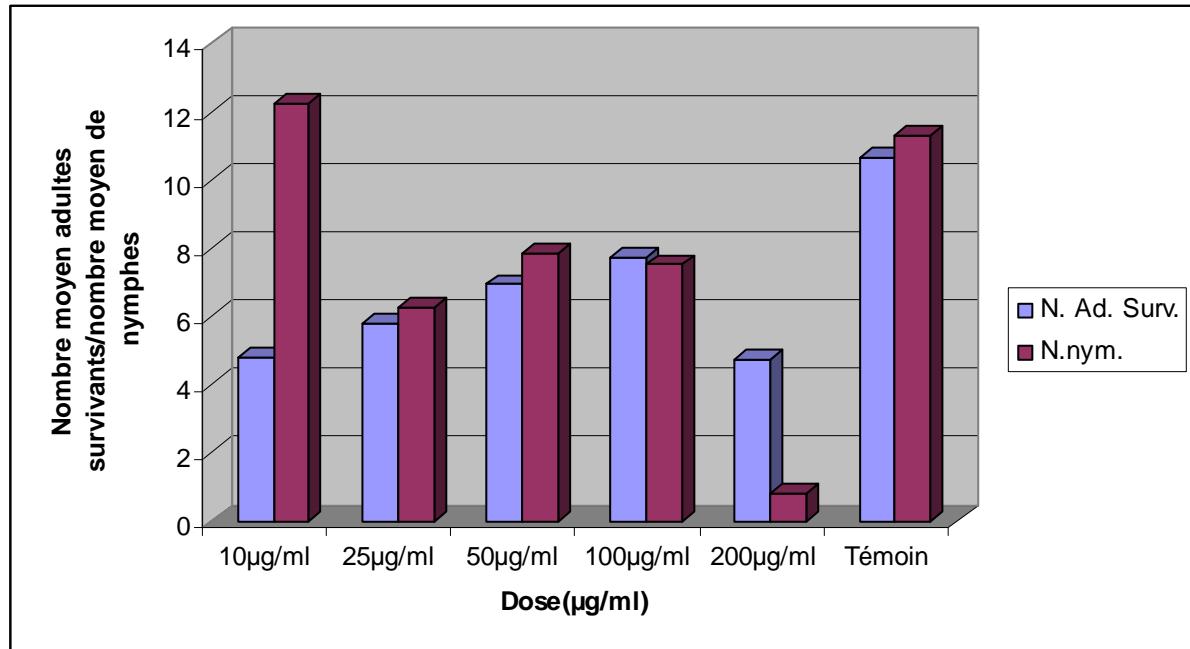


Figure 15 : Evolution de la survie et de la fécondité d'*A. pisum* en fonction des doses de chlortetracycline

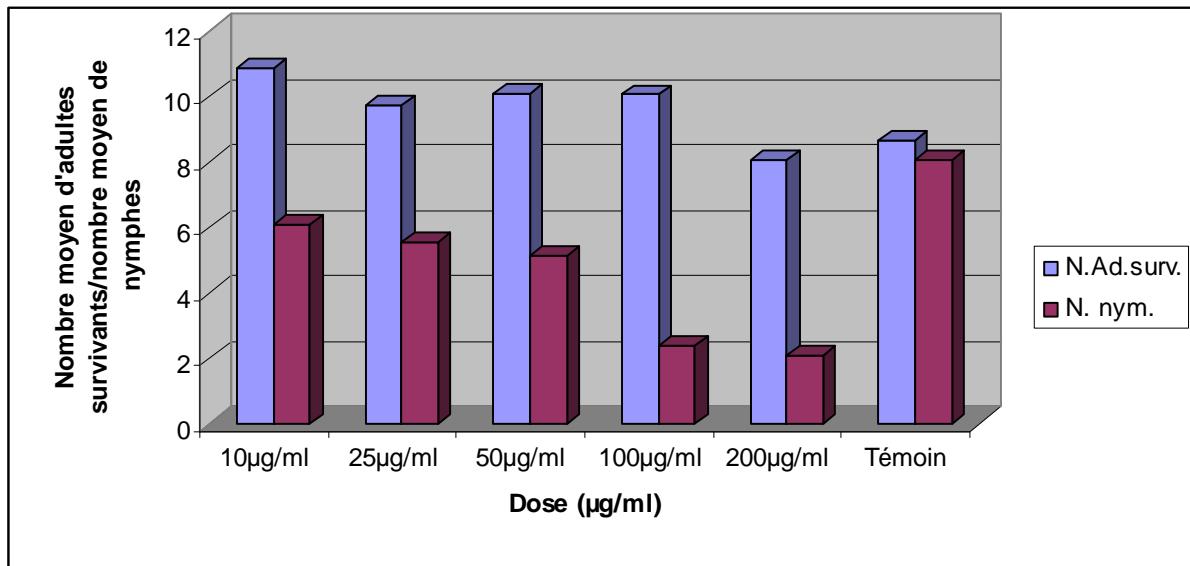


Figure 16 : Evolution de la survie et de la fécondité d'*A. pisum* en fonction des doses d'ampicilline

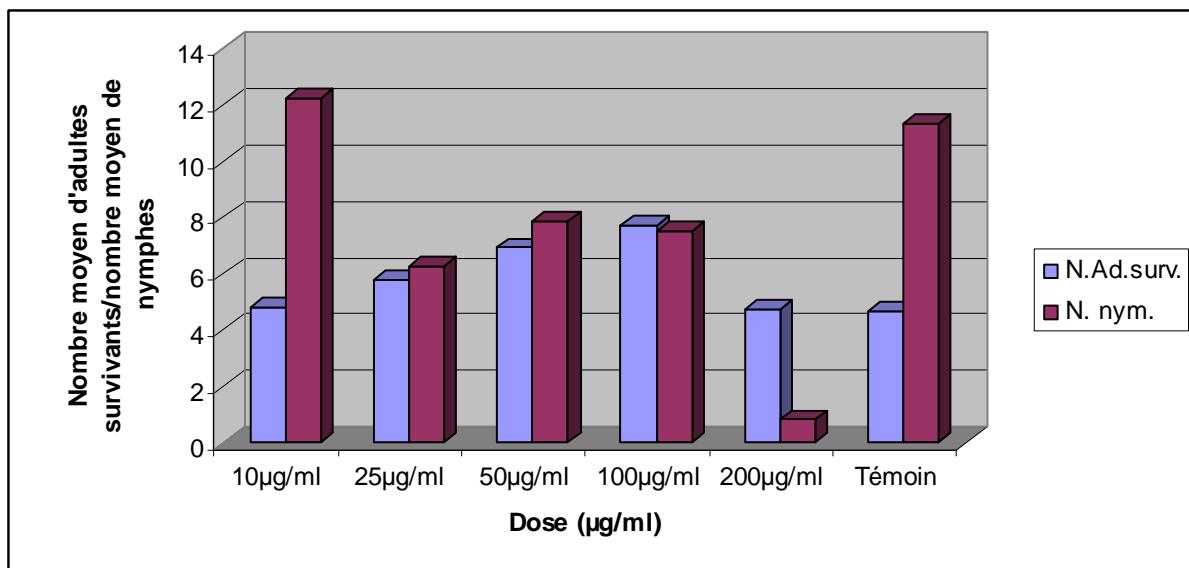


Figure 17 : Evolution de la survie et de la fécondité d'*A. pisum* en fonction des doses de rifampicine

1.2. Transfert des pucerons aposymbiotiques sur les plantes :

1.2.1. Evolution de la survie de *M. persicae* en fonction du temps et du type d'antibiotique après transfert sur *Vicia faba*

L'analyse statistique montre qu'il n'y a pas d'interaction entre le nombre de jour et le type d'antibiotique utilisé ($F_{12; 309} = 0,30$; $P = 0,989$), ni de différence significative entre les effets de différents antibiotiques ($F_2; 309 = 0,50$) ; $P = 0,605$). Par contre il existe une différence hautement significative entre les niveaux de jour après transfert du puceron sur V. faba ($F_6; 309 = 10,82$; $P < 0,001$).

L'analyse de la variance pour la survie montre une différence hautement significative entre les effets des traitements sur la survie du puceron à partir du troisième jour de l'essai. Par contre aucune différence significative n'a été enregistrée par rapport à l'effet des antibiotiques sur la survie du puceron. Les antibiotiques : la rifampicine, la chlortétracycline et le témoin ne présentent pas d'effets statistiquement différents.

1.2.2. Evolution de la fécondité de *M. persicae* en fonction du temps et du type d'antibiotique après transfert sur *Vicia faba*

La fécondité de *M. persicae* en fonction des jours et des types d'antibiotiques montrent une différence hautement significative entre les effets en fonction des jours ($F_6; 309 = 6,02$; $P < 0,001$) et des antibiotiques ($F_2; 309 = 9,78$; $P < 0,001$). Il n'y a pas d'interaction entre les effets en fonction du jour et ceux en fonction du type d'antibiotique ($F_{12; 309} = 0,85$; $P = 0,604$) sur la fécondité du puceron. Des différences significatives entre les effets des niveaux de jour sur la fécondité ont été enregistrées aux jours 5, 6 et 7 qui sont statistiquement équivalents.

La rifampicine et la chlortétracycline ne présentent pas de différence significative quant à leur effet sur la fécondité des pucerons après transfert sur la fève.

1.2.3. Evolution de la survie de *M. persicae* en fonction du temps et du type d'antibiotique après transfert sur *Arabidopsis thaliana*

L'analyse statistique de la variance pour la survie de *M. persicae* transféré sur *A. thaliana* révèle une différence hautement significative entre les niveaux de jour ($F_6; 189 = 3,59$; $P < 0,02$) et très hautement significative entre les effets des antibiotiques ($F_2; 189 = 11,15$;

$P<0,001$). L'effet des niveaux des jours n'est pas corrélé à celui des antibiotiques ($F_{12 ; 189}=0,65$; $P= 0,800$).

1.2.4. Evolution de la fécondité de *M. persicae* en fonction du temps et du type d'antibiotique après transfert sur *A. thaliana*

Une étude comparative montre qu'il ya une différence très hautement significative entre les niveaux des jours ($F (6 ; 189)= 39,53$; $P<0,001$) et aussi entre les antibiotiques ($F_2 ; 189= 84,07$; $P<0,001$). Une comparaison entre les effets du niveau des jours et des antibiotiques révèlent une interaction très hautement significative ($F_{12 ; 189}= 9,80$; $P<0,001$). Ce qui nous conduit à faire une analyse de variance à un facteur contrôlé de la fécondité du *M. persicae* pour chacune des variables.

1.2.4.1. Evolution de la fécondité de *M. persicae* en fonction des antibiotiques après transfert sur *A. thaliana* :

L'analyse la fécondité de *M. persicae* sur *A. thaliana* en fonction des deux types d'antibiotiques fait ressortir une différence très hautement significative entre les effets de la rifampicine et de la chlortétracycline ($F_2 ; 207= 32,00$; $P<0,001$). La fécondité est plus faible au niveau des pucerons nourris à la diète contenant la rifampicine qu'au niveau de ceux nourris au chlortétracycline. La plus forte fécondité est enregistrée sur le témoin.

1.2.4.2. Evolution de la fécondité de *M. persicae* en fonction du temps après transfert sur *A. thaliana* :

La fécondité des pucerons en fonction des niveaux des jours montre une différence hautement significative entre les effets des antibiotiques ($P<0,001$). Le nombre moyen de nymphes produit par *M. persicae* croit avec le temps

1.2.5. Evolution de la survie de *A. pisum* en fonction du temps et du type d'antibiotique après transfert sur *Vicia faba*

Pour rappel la plante-hôte *Vicia faba* a été infestée de 30 individus de *Acyrthosiphon pisum* qui ont élevés sur un système de diète artificielle incluant deux antibiotiques : la rifampicine et la chlortétracycline à la dose de $100\mu\text{g}/\text{ml}$ durant trois jours.

Ainsi, on constate que l'analyse de la variance pour la survie du puceron montre qu'il n'y a pas d'interaction entre le nombre de jour que le puceron a passé sur la plante et le type

d'antibiotique ($F_{12; 287} = 0,23$; $P = 0,997$). D'autre part des différences hautement significatives sont enregistrées entre les niveaux des jours ($F (6 ; 287) = 7,67$; $P < 0,001$) et ceux des antibiotiques ($F_{2; 287} = 13,32$; $P < 0,001$). Le nombre d'adultes de pucerons survivants varient en fonction des jours surtout à partir du deuxième jour et jours suivants. Les deux antibiotiques présentent des différences significatives quant à leurs effets sur la survie du puceron.

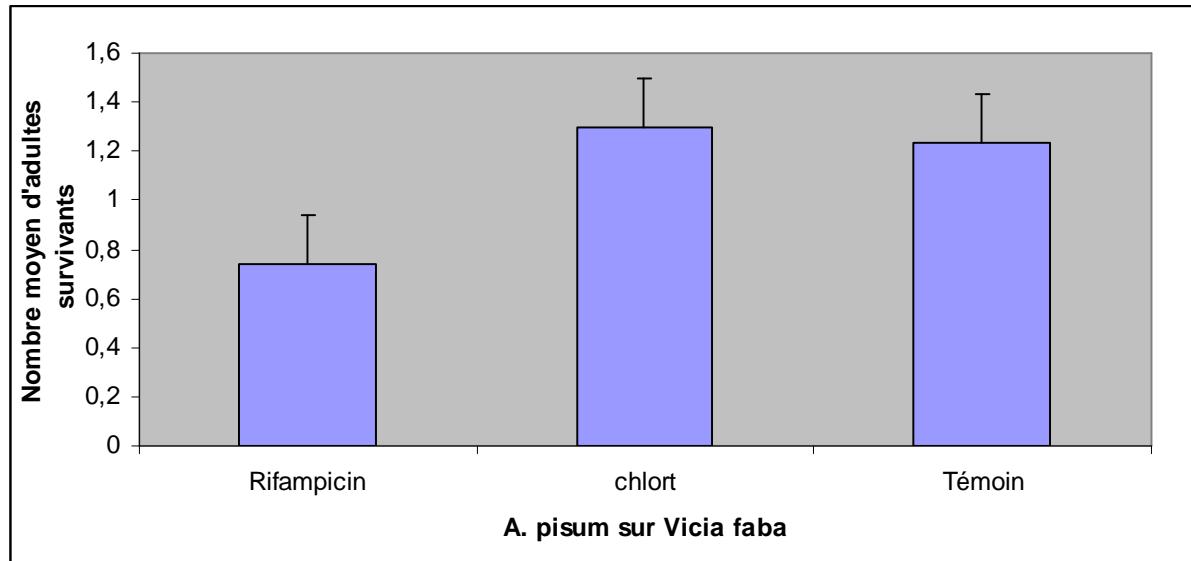


Figure 18 : Evolution de la survie d'*A. pisum* sur *Vicia faba*

1.2.5.1. Evolution de la fécondité d'*A. pisum* en fonction du temps et du type d'antibiotique après transfert sur *Vicia faba*

Une première approche consiste à déterminer s'il apparaît des différences de fécondité d'*A. pisum* entre les niveaux de jours et les antibiotiques : le test de Tukey ($F_{12; 287} = 0,79$; $P = 0,663$) montre qu'il n'y a pas de corrélation significativement différente entre les jours et les effets des antibiotiques.

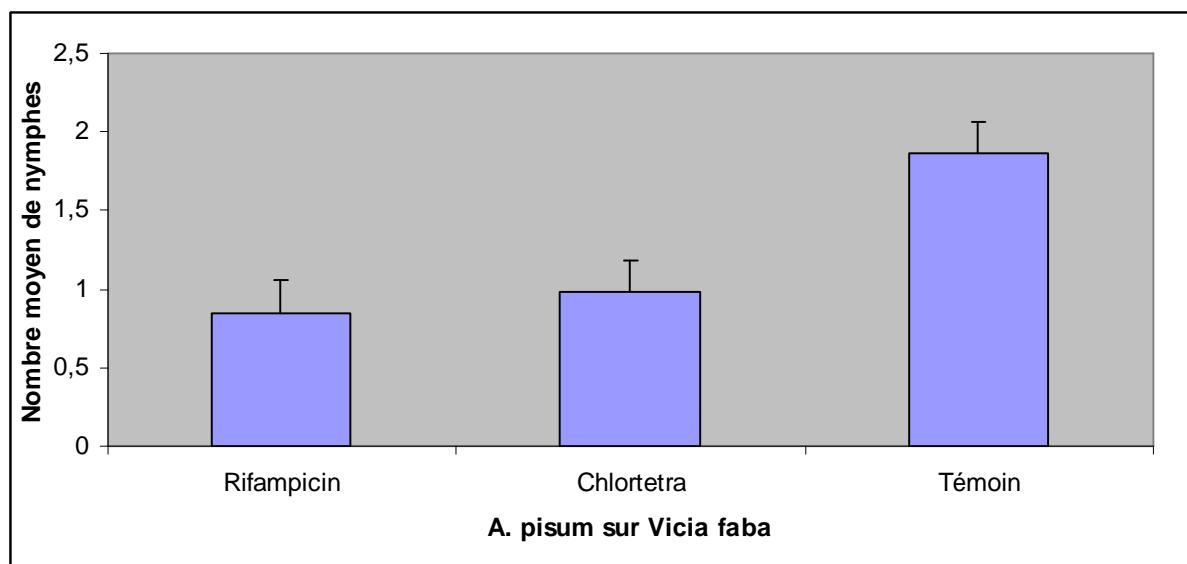


Figure 39 : Evolution de la survie d'*A. pisum* en fonction des antibiotiques après transfert sur *Vicia faba*

1.2.5.2. Evolution de la survie et de la fécondité d'*A. pisum* en fonction du temps et du type d'antibiotique après transfert sur *A. thaliana*

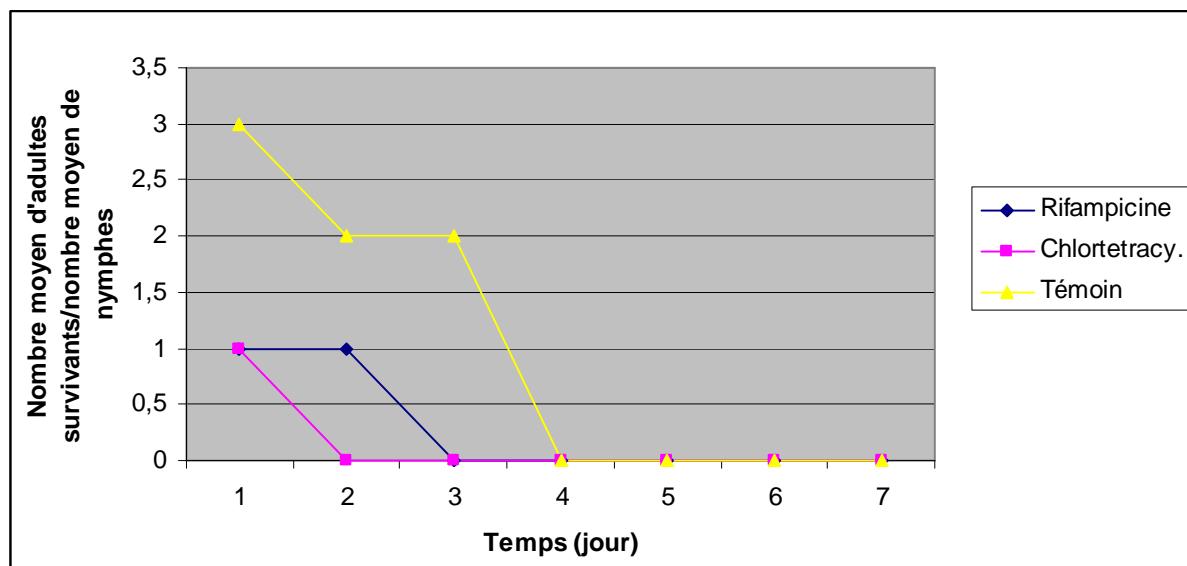


Figure 40 : Evolution de la survie et de la fécondité d'*A. pisum* en fonction du temps et des antibiotiques sur *A. thaliana*

1.3. Adaptation des pucerons : approche biochimique

Etude protéomique par électrophorèses à 1 et 2 dimensions

Les échantillons de pucerons alimentés sur les diètes artificielles incluant les antibiotiques impliquant le plus de changements biologiques ont été utilisés lors de cette approche protéomique. Une première étape a été de précipiter les protéines de pucerons ayant ingérés les différents antibiotiques lors de la phase d'alimentation par des diètes artificielles. Les protéines ont ensuite été séparées par méthode électrophorétique. Si les profils de protéines lors des électrophorèses monodimensionnelles sont difficilement interprétables au vu du peu de différences visuelles entre les bandes (figure 21), les gels bidimensionnels ont permis de visualiser l'effet des antibiotiques. A titre d'exemple, la comparaison des gels relatifs aux pucerons *A. pisum* élevés sur diète témoin et celle incluant la rifampicine est présentée à la figure 21.

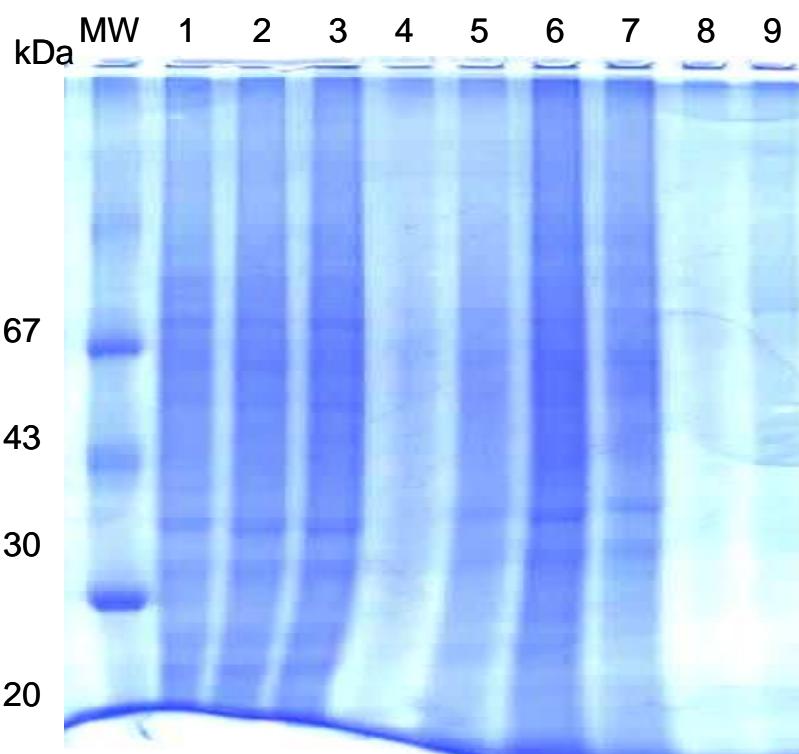


Figure 21 : gel d'électrophorèse monodimensionnelle des protéines du puceron *Myzus persicae* nourris sur diète artificielle témoin (1) et incluant soit la rifampicine (2), la chlortétracycline (3), du puceron *Acyrthosiphon pisum persicae* nourris sur diète artificielle témoin (5) et incluant soit la rifampicine (6), la chlortétracycline (7).

À la suite de la réalisation de gels 2D sur base des échantillons de pucerons ayant ingérés les antibiotiques et des aphides nourris avec des diètes témoins, les analyses d'images de ces gels ont permis d'identifier les protéines variant d'un facteur deux en terme d'expression d'un

traitement à un autre. Ces protéines d'intérêt seront ensuite digérées et analysées en spectrométrie de masse pour les identifier et déterminer les voies métaboliques impliquées lors de l'ingestion des antibiotiques utilisées.

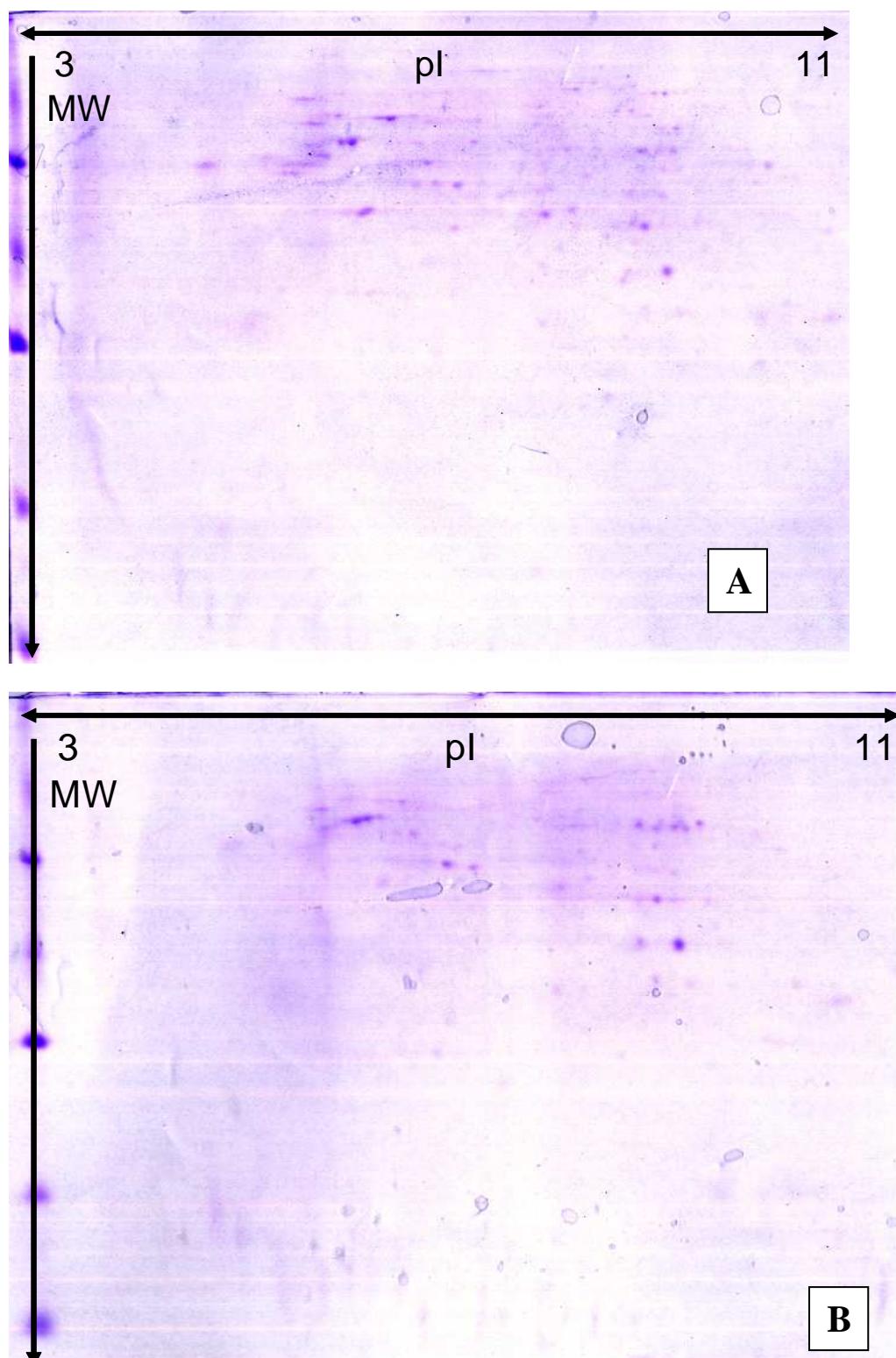


Figure 22 : gel d'électrophorèse bidimensionnelle de protéines d'*Acyrthosiphon pisum* élevé sur diète artificielle témoin sans antibiotiques (A) et avec de la rifampicine (B).

Suite à l'analyse des gels, de 190 à 232 spots ont été identifiés sur les gels en fonction du traitement considéré. Lors de la comparaison des protéines aphidiennes issues de l'alimentation des pucerons sur diètes avec des antibiotiques, vingt huit spots ont été identifiés comme variant d'un facteur 2,08 à 11,99 (ratio de valeurs de %Volume) en considérant le traitement à la chlortétracycline d'*A. pisum*. Vingt et un spots se sont révélés varier d'un facteur 2,00 à 9,11 lors de la comparaison des protéines du puceron du pois nourris sur diète témoin et de ceux alimentés avec la rifampicine. Les protéines d'intérêt seront analysées par spectrométrie de masse pour identification.

Les gels 2D réalisés représentent une première étape de caractérisation de variation du protéome de pucerons en fonction de traitement aux antibiotiques. Les résultats de l'identification des protéines variant significativement permettront de cibler les voies métaboliques impliquées.

A coté de la comparaison des protéomes de pucerons symbiotiques et des insectes soumis à des traitements antibiotiques, des extractions des bactéries symbiotiques ont également été réalisées pour se identifier l'origine des protéines lorsque l'insecte entier (pourvu de ses symbiontes) est étudié. A ce titre, les premiers gels relatifs aux protéomes des symbiontes purifiées d'*A. pisum* et *M. persicae* sont présentés à la figure 23.



Figure 23 : gel d'électrophorèse bidimensionnelle de protéines des bactéries symbiotiques extraites d'*Acyrthosiphon pisum* (A) et de *Myzus persicae* (B) élevés sur *Vicia faba*.

2. Discussion :

Adaptation des pucerons : Approche biologique

Nous avons remarqué une réduction très significative du nombre d'adultes survivants et de nymphes des deux espèces de pucerons (*M. persicae* et *A. pisum*), quand ceux-ci sont élevés sur la diète artificielle contenant de la chlortétracycline ou de la rifampicine comme antibiotiques. Le nombre d'adultes survivants ou de nymphes varient en fonction des doses de chlortetracycline. Ainsi, comparativement au témoin, le développement et la reproduction de *Myzus persicae* décroît, avec l'augmentation des doses. *Myzus persicae* se maintient et se reproduit un peu mieux à la dose de 10µg/ml, chute un peu plus à 25 et 50µg/ml et décroît sérieusement à 100 et 200 µg/ml. La chlortétracycline et la rifampicine ont certainement eu un effet sur la bactérie primaire *Buchnera aphidicola* qui n'arrive plus à fournir à son hôte les acides aminés essentiels dont il a besoin pour son développement. Cela se justifie par une diminution de la survie des pucerons (*M. persicae* et *A. pisum*) jouant ainsi de façon négative sur leur reproduction. Ces résultats confirment des études similaires menées par Ryichi Koga et al. (2006) qui ont trouvé que la rifampicine a un effet efficace dans l'élimination de *Buchnera* à partir du puceron *A. pisum*. Ce qui permet de l'utiliser pour étudier le rôle biologique du symbionte primaire (Rahbe et al. 1994). Récemment il a été démontré que le traitement à la rifampicine à des doses faibles élimine *Buchnera* le symbionte primaire des pucerons sans affecter l'infection par *Serratia*, un symbionte secondaire (Koga et al. 2003). Des doses plus élevées de rifampicine élimine complètement *Buchnera* du puceron, toujours selon le même auteur. D'autres études ont montré en effet que des pucerons rendus aposymbiotiques présentent une extraordinaire prolifération de microorganismes (Nakabachi et al., 2003), et qu'une infection par des symbiontes secondaires permet la survie et la reproduction des pucerons aposymbiotiques sur plusieurs générations(Koga et al.,2003). Il semblerait alors que les deux antibiotiques : la rifampicine et la chlortétracycline aient un effet négatif sur le symbionte primaire sans en affecter les symbiontes secondaires car malgré les fortes doses (100 et 200 µg/ml) appliquées sur *M. persicae* et *A. pisum*, ceux-ci continuent tout de même à reproduire mais de façon très faible. Ce qui pourrait faire penser que le symbionte facultatif ne peut pallier totalement les fonctions de *Buchnera*.

Quant à l'effet de l'ampicilline sur son effet est plus marqué sur *M. persicae* que sur *A. pisum*. En effet l'effet de l'ampicilline ne semble joué fortement sur le développement de *A. pisum* car malgré les fortes doses utilisées le *A. pisum* continue à se reproduire. Cela pourrait être dû au fait que l'ampicilline n'a pas eu d'effet sur le symbionte primaire, et donc ne perturbe pas le métabolisme du puceron. Ce résultat confirme des études récentes qui ont montré que le

traitement à l'ampicilline est efficace dans l'élimination des symbiontes secondaires des pucerons (*A. pisum*) comme *Regiella* (Leonardo, 2004 ; Tsuchida et al., 2004) et *Rickettsia* (Sakurai et al., 2005). Dans ce contexte l'application des techniques d'élimination sélective plus large que prévue pourraient être élargies à d'autres insectes et leurs endosymbiontes. L'ampicilline affecte de façon sélective le symbionte facultatif sans affecter la bactérie primaire *Buchnera* bien que qu'ils coexistent dans l'organisme du même hôte. L'action inhibitrice de la synthèse de la paroi des cellules bactériennes par l'ampicilline, peut être un facteur crucial responsable de cette sélection.

Adaptation des pucerons aposymbiotiques après transfert les plantes hôtes :

L'adaptation des pucerons à leurs plantes hôtes semble résulter notamment de la diversité et de l'abondance de bactéries symbiotiques (ou symbiontes). En effet, des symbiontes primaires (du genre *Buchnera*) parfois associées à d'autres espèces secondaires (comme les *Rickettsia*) participent activement au métabolisme des pucerons. Afin d'identifier le rôle de ces bactéries dans la relation entre les pucerons et leurs plantes hôtes, *Myzus persicae* (espèce généraliste) et *Acyrthosiphum pisum* (spécialiste des Fabaceae) ont été utilisés comme modèles élevés sur deux plantes hôtes : *Vicia faba* et *Arabidopsis thaliana*.

Les pucerons entretiennent une symbiose avec la bactérie *Buchnera aphidicola* (Buchner ,1965; Munson et al., 1991 ; Moran et Baumann 1994 ; Baumann et al., 1995). Cette symbiose est considérée comme obligatoire car les pucerons privés de la bactérie par des traitements antibiotiques deviennent stériles ou meurent (Houk et Griffiths ,1980; Ishikawa et Yamaji, 1985 ; Ohtaka et Ishikawa, 1991) tandis que *Buchnera* ne peut pas se développer à l'extérieur du puceron (Baumann et Moran 1997). Le puceron apporte à la bactérie une niche stable et des nutriments, tandis que le symbionte, localisé dans le cytoplasme de cellules hypertrophiées spécialisées dans la symbiose, synthétise des acides aminés essentiels et des nutriments (Baumann et al., 1995 ; Dixon 1998; Douglas 1998; Moran et Baumann 2000).

Le traitement antibiotique à pour objet de priver le puceron de ses symbiontes afin de mieux comprendre leur rôle de ceux-ci dans l'adaptation de l'insecte aux plantes hôtes.

Effet des antibiotiques sur le développement et la reproduction de *M. persicae* et d'*A. pisum* après transfert sur *Vicia faba* et *Arabidopsis thaliana* :

Les résultats de l'analyse des pucerons aposymbiotiques transférés sur *Vicia faba*(Fabaceae) montre un effet très significatif des antibiotiques sur le développement de *M. persicae*, à partir du troisième jour après leur transfert. Par contre aucune différence significative entre les deux types d'antibiotique n'a été enregistrée. *M. persicae* continue tout de même à se développer sur la fève. Sur *A. thaliana*, une Brassicaceae l'effet des antibiotiques sur la survie de *M. persicae* commence à partir du cinquième jour. Les pucerons nourris à la rifampicine présentent statistiquement les mêmes effets que ceux nourris à la chlortétracycline. Quant aux nombre de nymphes produits par cette espèce, des différences très significatives ont été enregistrées entre les antibiotiques. Ainsi, la fécondité est plus élevée au niveau des pucerons nourris à la chlortétracycline qu'au niveau de ceux nourris à la rifampicine. Le nombre de nymphes augmente de façon significative avec le temps. Ces résultats montrent donc la capacité de *M. persicae* à se développer sur une large gamme de plantes, de familles botaniques différentes, faisant ainsi ressortir le caractère polyphage de cette espèce.

Le suivi de la survie *d'A. pisum* sur *vicia faba*, ne fait ressortir aucun effet significatif des antibiotiques en fonction du temps. Concernant la fécondité, du puceron, aucun effet des antibiotiques n'a été remarqué. Si *A. pisum* parvient à se maintenir sur *Vicia faba*, il n'en ait pas de même pour *A. thaliana* car tous les pucerons aposymbiotiques (30 au total) ont péri après deux jours d'observation et quatre jours pour le témoin. *A. pisum* n'a pu donc, se développer, ni se reproduire sur la plante *A. thaliana*, montrant ainsi son caractère monophage.

Approche biochimique :

Les échantillons de pucerons alimentés sur les diètes artificielles incluant les antibiotiques impliquant le plus de changements biologiques ont été utilisés lors de cette approche protéomique. Les profils de protéines lors des électrophorèses monodimensionnelles sont difficilement interprétables au vu du peu de différences visuelles entre les bandes, les gels bidimensionnels ont permis de visualiser l'effet des antibiotiques. Ce qui a permis d'identifier des protéines variant d'un facteur deux en terme d'expression d'un traitement à un autre. Ces protéines d'intérêt seront ensuite digérées et analysées en spectrométrie de masse pour les identifier et déterminer les voies métaboliques impliquées lors de l'ingestion des antibiotiques utilisées. Des différences significatives de composition du protéome des bactéries symbiotiques issues des deux espèces de pucerons sont donc visualisées. Le rôle de ces

symbiontes dans l'adaptation des insectes face aux plantes hôtes a déjà pu être mis en évidence lors d'observations biologiques. Cette étude représente une première approche biochimique afin d'identifier les protéines impliquées dans les réponses différentielles des pucerons face à leur environnement proche, y compris l'espèce végétale au dépend de laquelle les pucerons s'alimentent.

Conclusion et perspectives

Ce travail a été réalisé en utilisant deux espèces de pucerons : *Myzus persicae* et *Acythosiphon pisum*, élevées d'une part sur un système de diète artificielle, incluant trois antibiotiques (la chlortetracycline, rifampicine et l'ampicilline), d'autres part le transfert des pucerons aposymbiotiques sur deux plantes de familles botaniques différentes. Pour comprendre le rôle des bactéries symbiotiques des pucerons dans l'adaptation à leur plantes hôtes, deux approches ont été envisagées dans ce travail :

1. Approche biologique : les observations biologiques ont montré que le nombre d'adultes survivants ou de nymphes varient en fonction des doses de chlortétracycline et de la rifampicine. Le développement et la reproduction de *Myzus persicae* décroît, avec l'augmentation des doses. La plus forte mortalité des pucerons est enregistrée aux doses de 100 et 200 µg/ml, pour les deux espèces de pucerons. Ainsi, les pucerons élevés sur les doses 50, 100 et 200 µg /ml ont enregistré la plus faible moyenne de nymphes émergeant, par rapport aux doses de 10 ; 25 µg/ml, quand ceux sont élevés sur la diète artificielle contenant soit de la chlortetracycline, soit de la rifampicine. Les concentrations d'ampicilline utilisées ne semblent pas avoir d'effet significatif sur la survie de *M. persicae* et d'*A. pisum*, même si des différences hautement significatives sur la fécondité des pucerons ont été révélées. Les performances biologiques des deux espèces de pucerons sur les plantes hôtes diffèrent significativement. *Myzus persicae* peut survivre sur *Vicia faba* et *Arabidopsis thaliana*. Alors que, *Acyrthosiphon pisum* est incapable de se développer sur *A. thaliana*.
2. Approche biochimique : Les échantillons de pucerons alimentés sur les diètes artificielles incluant les antibiotiques impliquant le plus de changements biologiques ont été utilisés lors de cette approche protéomique. A la suite de la réalisation de gels 2D sur base des échantillons de pucerons ayant ingérés les antibiotiques et des aphides nourris avec des diètes témoins, les analyses d'images de ces gels ont permis d'identifier les protéines variant d'un facteur deux en terme d'expression d'un traitement à un autre. Cette étude représente une première approche biochimique afin d'identifier les protéines impliquées dans les réponses différentielles des pucerons face à leur environnement proche, y compris l'espèce végétale au dépend de laquelle les pucerons s'alimentent.

Au regard de ces résultats, diverses perspectives concernant la compréhension du rôle des bactéries symbiotiques peuvent être envisagées, notamment :

L'effet de l'interaction symbionte primaire-symbionte secondaire sur le développement des pucerons ;

- développement de nouveaux protocoles de manipulations des endosymbiontes.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

Alistair C. Darby, Lucinda M. Birkle, Sarah L. Turner and Angela E. Douglas.(2001), An aphid-borne bacterium allied to the secondary symbionts of whitefly, article, FEMS Microbiology Eclogy, Volume 36, Issue : 1, pages: 43-50.

Anonyme. (2004), 2-D electrophoresis: Principe and methods, handbooks from GE Healthcare, Pages: 162

Atsushi Nakabachi, Hajime Ishikawa et Toshiaki Kudoa. (2003), Extraordinary proliferation of microorganisms in aposymbiotic pea aphids, *Acyrtosiphon pisum*, Molecular Microbial Ecology Division, Bioscience Technology Center, RIKEN, (The Institute of Physical and Chemical Research), Hirosawa 2-1, Wako-shi, Saitama 351-0198, Japan, *Journal of Invertebrate Pathology* , pp.152–161.

Bennett MD, Leitch IJ, Price HJ and Johnston JS.(2003), Comparisons with *Caenorhabditis* (~100 Mb) and *Drosophila* (~ 175 Mb) using flow cytometry show genome size in *Arabidopsis* to be ~157 Mb and thus ~25 % larger than the *Arabidopsis* Genome Initiative estimate of ~125 MB. *Annals of Botany*, 91: 547-557.

C. Marina cailla UD et Y Van R A H B. (1999), Aposymbiosis in a ce real aphid : reproductive failure and influence on plant utilization, Department of Entomology, Cornell University, U.S.A., Laboratoire de Zoologie, INRA-ENSA, Le Rheu, France, \$Laboratoire de Biologie appliquée, INRA-INSA, Villeurbanne, France.

Claude Rispe, (2005), Sexualité, clonalité et évolution du génome, chez les pucerons et leurs bactéries symbiotiques, document de synthèse, Equipe de Biologie et génétique des populations d'insectes, UMR bio3P INRA-Agrocampus Rennes/Le Rheu, 94p.

Evelyn Zientz,Thomas Dandekar et Roy Grosse. (2004), Metabolic Interdependence of Obligate Intracellular Bacteria and Their Insect Hosts, *microbiology and molecular biology reviews*, 68, No. 4 , p. 745-770.

Francis, F, Gerkens, P, Harmel, N, Mazzucchelli, G, De Pauw, E & Haubrige, E. (2006), Proteomics in *Myzus persicae*: Effect of aphid host plant switch, Insect Biochemistry and Molecular Biology, Issue: 36, Pages : 219-227.

Francis, F, Harmel, N, Gerkens, P, De Pauw, E & Haubrige, E. (2005), Aphid Adaptation to plant Defence System, Insect, Nature and Humans, 5 th Asia-Pacific, Congress of Entomology, october 18-21, 2005, Jeju, Korea : 39.

Francis, F, Harmel, N, Almohamad, R & Haubrige, E (2005), Indirect Defence of aphid Infested Potato : Role of Terpenes on *Episyrrhus balteatus* Behaviour, Insect, Nature and Humans, 5 th Asia-Pacific, Congress of Entomology, october 18-21, 2005, Jeju, Korea : 140.

Fukatsu.(2005), *Rickettsia* Symbiont in the Pea Aphid *Acyrtosiphon pisum*: Novel Cellular Tropism, Effect on Host Fitness, and Interaction with the Essential Symbiont *Buchnera*, Institute for Biological Resources and Functions, National Institute of Advanced Industrial Science and Technology (AIST), Tsukuba 305-8566, Japan, p. 4069–4075 Vol. 71, No. 7.

Hajime Ishikawa,(2002), host-symbiont interactions in the protein synthesis in the pea aphid, *Acyrtosiphon pisum*, Department of Biology, College of General Education, University of Tokyo, Komaba, Meguro-ku, Tokyo 153, Japan.

Hajime Ishikawa. (1984), Characterization of the protein species synthesized *in vivo* and *in vitro* by an aphid endosymbiont, article, Insect Biochemistry, Volume 14, Issue 4, Pages 417-425

Hajime Ishikawa et Munetoshi Yamaji. (1985), Symbionin, an aphid endosymbiont-specific protein—I : Production of insects deficient in symbiont, article, Insect Biochemistry, Volume 15, Issue 2, Pages 155-163.

Hajime Ishikawa. (1984), Control of macromolecule synthesis in the aphid endosymbiont by the host insect, article, Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology, Volume 78, Issue 1, Pages: 51-57.

Harmel Nicolas (2005). Etude biochimique et moléculaire de l'adaptation du puceron *Myzus persicae* Sulzer (1776) à *Solanum tuberosum L.* Mémoire de fin d'études, Gembloux, FUSAGX, f, 76 pp.

Hajime Ishikawa and Munetoshi Yamaji. (1985), Symbionin, an aphid endosymbiont-specific protein—I: Production of insects deficient in symbiont, article, *Insect Biochemistry*, Volume 15, Issue 2, Pages: 155-163.

Hubert Charles. (1997), Aspects moléculaires de la bactérie symbiotiques principale du charançon des céréales *Sitophilus oryzae* (Coléoptère, Curculionidae) et étude de ses interactions avec l'hôte, thèse de doctorat, 134 pp.

Hubert Charles, Hajime Ishikawa. (1999), Physical and genetic map of the genome of Buchnera, the primary endosymbiont of the pea aphid *Acyrthosiphon pisum*, department of Biological sciences, University of Tokyo, vol. 48, pp. 142-150.

I. Liadouze, G. Febvay, J. Guillaud and G. Bonnot.(1995), Effect of diet on the free amino acid pools of symbiotic and aposymbiotic pea aphids, *Acyrthosiphon pisum*, article, *Journal of Insect Physiology*, Volume 41, Issue 1, Pages 33-40.

J. Sandström, A. Telang and N. A. Moran.(2000), Nutritional enhancement of host plants by aphids — a comparison of three aphid species on grasses, article, Department of Ecology and Evolutionary Biology, University of Arizona, Tucson, AZ 85721, USA, *Journal of Insect Physiology*, Volume 46, Issue 1, Pages 33-40.

Kanako Komaki, Hajime Ishikawa.(2000), Genomic copy number of intracellular bacterial symbionts of aphids varies in response to developmental stage and morph of their host Department of Biological Sciences, Graduate School of Science, University of Tokyo, Hongo, Bunkyo-ku, Tokyo 113-0033, Japan, *Insect Biochemistry and Molecular Biology* 30, Pages: 253–258.

Kerry M. Oliver, Nancy A. Moran, et Martha S. Hunter. (2005), Variation in resistance to parasitism in aphids is due to symbionts not host genotype, Departments of Entomology and Ecology and Evolutionary Biology, University of Arizona, Tucson, AZ 85721.

Laurent Miguet. (2006), Nouvelles méthodologies dans l'analyse protéomique par spectrométrie de masse. Application à la recherche de biomarqueurs dans le cadre des leucémies, thèse de doctorat, 216pp.

Liadouze Isabelle.(1995), Etude du métabolisme azoté chez Acyrthosiphon pisum (Harris) (Homoptera: Aphididae), rôle des bactéries symbiotiques (Nitrogen metabolism in the pea aphid Acyrthosiphon pisum (Harris) (Homoptera: Aphididae), influence of symbiotic bacteria), Article.

Laura Gomez-valero, Mario Soriano-Navarro, Vicente Perez-Brocal, Abdelaziz Heddi, Andres Moya, José Manuel Garcia-Verdugo, et Amparo Latorre. (2004), Coexistence of *Wolbachia* with *Buchnera aphidicola* and a secondary symbiont in the pea aphid *Cinary cedri*, Journal of bacteriology, pages: 6626-6633.

Nancy A. Moran et Paul Baumann. (2000), Bacterial endosymbionts animals, Department of Ecology and Evolutionary Biology, University of Arizona, Issue: 3, Pages: 270-275.

Nancy A. Moran, Helen E. Dunbar, et Jennifer L. Wilcox. (2005), Regulation of transcription in a reduced bacterial genome: nutrient-provisioning genes of the obligate symbiont *Buchnera aphidicola*, department of Ecology and Evolutionary Biology, University of Arizona, pages: 4229-4237.

Nancie Reymond. (2005), Bioinformatique des puces à ADN et application à l'analyse du transcriptome de *Buchnera aphidicola*, thèse de doctorat présentée devant l'Institut national des Sciences Appliquées de Lyon, 325 pp.

Ryichi Koga, Tsutomu Tsuchida, Makiko, Sakurai et Takema Fakatsu. (2007), selective elemination of aphid endosymbionts : effects of antibiotic dose and host genotype, and fitness consequences, Institute of Biological ressources and Function, National Institute of Advanced Industrial Science and Technology(AIST), Tsukuba, Japan, FEMS Microbial Ecol. 60, pages: 229-239.

Ryichi Koga, Tsutomu Tsuchida, Makiko et Takema Fukatsu. (2003), Changing partners in an obligate symbiosis: a facultative endosymbiont can compensate for loss of the essential endosymbiont *Buchnera* in an aphid, Institute of Biological ressources and Function, National Institute of Advanced Industrial Science and Technology(AIST), Tsukuba, Japan, pages: 2543-2550.

Sophie Richert. (2003), De l'identification à la caractérisation des protéines : développement de la spectrométrie de masse dans le cadre de l'approche protéomique, thèse de doctorat, Université Louis Pasteur de Strasbourg, Pages : 232

Takema Fukatsu, Naruo Nikoh, Rena Kawai et Ryichi Koga. (2000), The secondary endosymbiont of the pea aphid *Acyrtosiphon pisum*(insecta: Homoptera), National institute of Bioscience and human-technology, Agency of Industrial Science and technology, Tsukuba, Japon, Pages: 2748-2758.

T. L. Wilkinson, T. Fukatsu et H. Ishikawa,(2003), Transmission of symbiotic bacteria *Buchnera* to parthenogenetic embryos in the aphid *Acyrtosiphon pisum* (Hemiptera: Aphidoidea) • short communication, Arthropod Structure & Development, Volume 32, Issues 2-3, , Pages 241-245.

T. L. Wilkinson,(1998), The elimination of intracellular microorganisms from insects: an analysis of antibiotic-treatment in the pea aphid (*Acyrtosiphon pisum*), article, Comparative Biochemistry and Physiology - Part A: Molecular & Integrative Physiology, Volume 119, Issue: 4-1, Pages: 871-881.

T. L. Wilkinson et H. Ishikawa. (1999), The assimilation and allocation of nutrients by symbiotic and aposymbiotic pea aphids, *Acyrtosiphon pisum*, department of biological Sciences, graduate of school of Science, University of Tokyo, issue: 91, Pages: 195-201.

T. L. Wilkinson et H. Ishikawa. (2001), On the functional significance of symbiotic microorganisms in the Homoptera: Comparative study of *Acyrtosiphon pisum* and *Nilaparvata lugens*, department of biological Sciences, graduate school of science, University of Tokyo, Vol. 26, pp.86-93.

Tetsuhiko Sasaki and Hajime Ishikawa. (1995), Production of essential amino acids from glutamate by mycetocyte symbionts of the pea aphid, *Acyrtosiphon pisum*, article, Journal of Insect Physiology, Volume 41, Issue 1, January, Pages 41-46.

Tsutomu Tsuchida, Ryuichi Koga, Makiko Sakurai and Takema Fukatsu.(2005), Facultative bacterial endosymbionts of three aphid species, *Aphis craccivora*, *Megoura crassicauda* and *Acyrtosiphon pisum*, sympatrically found on the same host plants, Institute for Biological Resources and Functions, National Institute of Advanced Industrial Science and Technology; Tsukuba, 305–8566, Japan.

Tsutomu Tsuchida, Ryichi Koga, Harunobu Shibao, Tadao Matsumoto et Takema Fukatsu.(2002), Diversity and geographic distribution of secondary endosymbiotic bacteria in natural populations of the pea aphid, *Acyrtosiphon pisum*, Molecular Ecology, Vol. 11, Issue: 10, pp. 2123-2135.

Tsutomu Tsuchida, Ryuichi Koga, Makiko Sakurai and Takema Fukatsu. (2006), Facultative bacterial endosymbionts of three aphid species, *Aphis craccivora*, *Megoura crassicauda* and *Acyrtosiphon pisum*, sympatrically found on the same host plants, National Institute of Advanced Industrial Science and Technology; Tsukuba 305–8566, Japan, pp.129–137.