N° d'ordre 97 ISAL0041 Année 1997

THÈSE

présentée

devant l'**INSTITUT NATIONAL DES SCIENCES APPLIQUÉES DE LYON**

Pour obtenir

LE GRADE DE DOCTEUR

FORMATION DOCTORALE : Analyse et Modélisation des Systèmes Biologiques

par

Hubert CHARLES
(DEA d'Analyse et Modélisation des Systèmes Biologiques)

Aspects moléculaires de la bactérie symbiotique principale du charançon des céréales *Sitophilus oryzae* (Coléoptère, Curculionidae) et étude de ses interactions avec l'hôte

soutenue le 24 juin 1997 devant la commission d'examen

JURY :	Mr O. Fayet	Rapporteur
	Mr C. Gautier	Rapporteur
	Mr P. Lejeune	Examinateur
	Mr P. Nardon	Examinateur
	Mr G. Riba	Examinateur
	Mr T. Rigaud	Examinateur

Laboratoire de Biologie Appliquée
INSA 406 UA-INRA 203 SDI-CNRS 5128,
20, Avenue Albert Einstein
69621 Villeurbanne Cedex FRANCE

INSA de Lyon
Département des études doctorales

ECOLES DOCTORALES

- **MATERIAUX DE LYON**
  INSAL – ECL -UCB. Lyon1 – Univ. De Chambéry – ENS

  Responsable : Professeur A. HOAREAU, UCBL (Tél. : 04.72.44.85.66)

  Formations doctorales associées :
  - Génie des Matériaux (Pr. R. FOUGERES, Tél : 04. 72. 43. 81 .49)
  - Matière condensée surfaces et interfaces (Pr. G. GUILLOT, Tél : 04.72.43.81.61)
  - Matériaux polymères et composites (Pr. H. SAUTEREAU, Tél : 04.72.43.81.78)

- **MECANIQUE, ENERGETIQUE, GENIE CIVIL, ACOUSTIQUE (MEGA)°**

  Responsable : Professeur J. BATAILLE, ECL (Tél : 04.72.43.8079)

  Formations doctorales associées :
  - Acoustique (Pr. J.L. GUYADER, Tél : 04.72.43.80.80)
  - Génie Civil : Sols, matériaux, structures, physique du bâtiment (Pr. P. LAREAL, Tél : 04.72.43.82.16)
  - Mécanique (Pr. G. DALMAZ, Tél : 04.72.43.83.03)
  - Thermique et Energétique (Pr. M. LALLEMAND, Tél : 04.72.43.81.54)

- **ELECTRONIQUE, ELECTROTECHNIQUE, AUTOMATIQUE (EEA)**
  INSAL - ECL – UCB. Lyon1 – Univ. de Saint-Etienne

  Responsable : Professeur G. GIMENEZ, INSAL (Tél : 04.72.43.83.32)

  Formations doctorales associées :
  - Acoustique (Pr. J.L. GUYADER, Tél : 04.72.43.80.80)
  - Automatique Industrielle (Pr. SCAVARDA, Tél : 04.72.43.83.41)
  - Dispositifs de l'électronique intégrée (Pr. P. PINARD, Tél : 04.72.43.80.79)
  - Génie biologique et médical (Pr. I MAGNIN, Tél : 04.72.43.85.63)
  - Génie électrique (Pr. J.P. CHANTE, Tél : 04.72.43.87.26)
  - Signal, Image, Parole (Pr. G. GIMENEZ, Tél : 04.72.43.83.32)

- **ECOLE DOCTORALE INTERDISCIPLINAIRE SCIENCES-SANTE (EDISS)**
  INSAL – UCB Lyon1 – Univ. de Saint-Etienne – Univ. Aix-Marseille2

  Responsable : Professeur A. COZZONE, CNRS-Lyon (Tél 04.72.72.26.75)

  Formations doctorales associées :
  - Biochimie (Pr. M. LAGARDE, Tél : 04.72.43.82.40)
  - Génie biologique et médical (Pr. I. MAGNIN, Tél : 04.72.43.85.63)

INSA de LYON
Département des Etudes Doctorales

AUTRES FORMATIONS DOCTORALES

- **ANALYSE ET MODELISATION DES SYSTEMES BIOLOGIQUE**

  Responsable : Professeur S. GRENIER, INSAL
  Tél : 04.72.43.83.56

- **CHIMIE INORGANIQUE**

  Responsable : Professeur P. GONNARD, INSAL
  Tél : 04.72.43.81.58

- **CONCEPTION EN BATIMENT ET TECHNIQUE URBAINES**

  Responsable : Professeur M. MIRAMOND, INSAL
  Tél : 04.72.43.82.09

- **DEA INFORMATIQUE DE LYON**

  Responsable : Professeur J.M. JOLION, INSAL
  Tél : 04.72.43.87.59

- **PRODUCTIQUE : ORGANISATION ECONOMIQUE ET GENIE INFORMATIQUE POUR L'ENTREPRISE**

  Responsable : Professeur J. FAVREL, INSAL
  Tél : 04.72.43.83.63

- **SCIENCES ET TECHNIQUES DU DECHET**

  Responsable : Professeur P. MOSZKOWICZ, INSAL
  Tél : 04.72.43.83.45

Janvier 1998

Institut National des Sciences Appliquées de Lyon

Directeur : J. Rochat

Professeurs

S.	**AUDISIO**	PHYSICOCHIMIE INDUSTRIELLE
J.C.	**BABOUX**	GEMPPM*
B.	**BALLAND**	PHYSIQUE DE LA MATIERE
D.	**BARBIER**	PHYSIQUE DE LA MATIERE
G.	**BAYADA**	MODELISATION MATHEMATIQUE ET CALCUL SCIENTIFIQUE
C.	**BERGER** (Mlle**)**	PHYSIQUE DE LA MATIERE
M.	**BETEMPS**	AUTOMATIQUE INDUSTRIELLE
J.M.	**BLANCHARD**	LAEPSI**
C.	**BOISSON**	VIBRATIONS ACOUSTIQUES
M.	**BOIVIN**	MECANIQUE DES SOLIDES
H.	**BOTTA**	EQUIPE DEVELOPPEMENT URBAIN
G.	**BOULAYE**	INFORMATIQUE
J.	**BRAU**	CENTRE DE THERMIQUE
M.	**BRISSAUD**	GENIE ELECTRIQUE ET FERROELECTRICITE
M.	**BRUNET**	MECANIQUE DES SOLIDES
J.C.	**BUREAU**	THERMODYNAMIQUE APPLIQUEE
J.Y.	**CAVAILLE**	GEMPPM*
J.P.	**CHANTE**	COMPOSANTS DE PUISSANCE ET APPLICATIONS
B.	**CHOCAT**	UNITE DE RECHERCHE EN GENIE CIVIL
B.	**CLAUDEL**	LAEPSI**
M.	**COUSIN**	UNITE DE RECHERCHE EN GENIE CIVIL
M.	**DIOT**	THERMODYNAMIQUE APPLIQUEE
A.	**DOUTHEAU**	CHIMIE ORGANIQUE
R.	**DUFOUR**	MECANIQUE DES STRUCTURES
J.C.	**DUPUY**	PHYSIQUE DE LA MATIERE
H.	**EMPTOZ**	RECONNAISSANCE DES FORMES ET VISION
C.	**ESNOUF**	GEMPPM*
L.	**EYRAUD** (Prof. Emérite)	GENIE ELECTRIQUE ET FERROELECTRICITE
G.	**FANTOZZI**	GEMPPM*
M.	**FAYET**	MECANIQUE DES SOLIDES
J.	**FAVREL**	GROUPE DE RECHERCHE EN PRODUCTIQUE ET INFORMATIQUE DES SYSTEMES MANUFACTURIERS
G.	**FERRARIS-BESSO**	MECANIQUE DES STRUCTURES
Y.	**FETIVEAU**	GENIE ELECTRIQUE ET FERROELECTRICITE
L.	**FLAMAND**	MECANIQUE DES CONTACTS
P.	**FLEISCHMANN**	GEMPPM*
A.	**FLORY**	INGENIERIE DES SYSTEMES D'INFORMATION
R.	**FOUGERES**	GEMPPM*
F.	**FOUQUET**	GEMPPM*
L.	**FRECON**	INFORMATIQUE
R.	**GAUTHIER**	PHYSIQUE DE LA MATIERE
M.	**GERY**	CENTRE DE THERMIQUE
G.	**GIMENEZ**	CREATIS***
P.	**GOBIN** (Prof. émérite)	GEMPPM*
P.	**GONNARD**	GENIE ELECTRIQUE ET FERROELECTRICITE
M.	**GONTRAND**	COMPOSANTS DE PUISSANCE ET APPLICATIONS
R.	**GOUTTE** (Prof. Emérite)	CREATIS***
G.	**GRANGE**	GENIE ELECTRIQUE ET FERROELECTRICITE
G.	**GUENIN**	GEMPPM*
M.	**GUICHARDANT**	BIOCHIMIE ET PARMACOLOGIE
G.	**GUILLOT**	PHYSIQUE DE LA MATIERE
A.	**GUINET**	GROUPE DE RECHERCHE EN PRODUCTIQUE ET INFORMATIQUE DES SYSTEMES MANUFACTURIERS
J.L.	**GUYADER**	VIBRATIONS ACOUSTIQUES
J.P.	**GUYOMAR**	GENIE ELECTRIQUE ET FERROELECTRICITE
J.M.	**JOLION**	RECONNAISSANCE DES FORMES ET VISION
J.F.	**JULLIEN**	UNITE DE RECHERCHE EN GENIE CIVIL
A.	**JUTARD**	AUTOMATIQUE INDUSTRIELLE
R.	**KASTNER**	UNITE DE RECHERCHE EN GENIE CIVIL
H.	**KLEIMANN**	GENIE ELECTRIQUE ET FERROELECTRICITE
J.	**KOULOUMDJIAN**	INGENIERIE DES SYSTEMES D'INFORMATION
M.	**LAGARDE**	BIOCHIMIE ET PARMACOLOGIE
M.	**LALANNE**	MECANIQUE DES STRUCTURES
A.	**LALLEMAND**	CENTRE DE THERMIQUE
M.	**LALLEMAND** (Mme)	CENTRE DE THERMIQUE
P.	**LAREAL**	UNITE DE RECHERCHE EN GENIE CIVIL
A.	**LAUGIER**	PHYSIQUE DE LA MATIERE
Ch.	**LAUGIER**	BIOCHIMIE ET PARMACOLOGIE
P.	**LEJEUNE**	GENETIQUE MOLECULAIRE DES MICROORGANISMES

A.	**LUBRECHT**	MECANIQUE DES CONTACTS
Y.	**MARTINEZ**	INGENIERIE DES SYSTEMES D'INFORMATION
H.	**MAZILLE**	PHYSICOCHIMIE INDUSTRIELLE
P.	**MERLE**	GEMPPM*
J.	**MERLIN**	GEMPPM*
J.P.	**MILLET**	PHYSICOCHIMIE INDUSTRIELLE
M.	**MIRAMOND**	UNITE DE RECHERCHE EN GENIE CIVIL
N.	**MONGEREAU** (Prof. Emérite)	UNITE DE RECHERCHE EN GENIE CIVIL
R.	**MOREL**	MECANIQUE DES FLUIDES
P.	**MOSZKOWICZ**	LAEPSI**
P.	**NARDON**	BIOLOGIE APPLIQUEE
A.	**NAVARRO**	LAEPSI**
A.	**NOURI** (Mme)	MODELISATION MATHEMATIQUE ET CALCUL SCIENTIFIQUE
M.	**OTTERBEIN**	LAEPSI**
J.P.	**PASCAULT**	MATERIAUX MACROMOLECULAIRES
G.	**PAVIC**	VIBRATIONS ACOUSTIQUES
J.	**PERA**	UNITE DE RECHERCHE EN GENIE CIVIL
G.	**PERRACHON**	THERMODYNAMIQUE APPLIQUEE
J.	**PEREZ** (Prof. Emérite)	GEMPPM*
P.	**PINARD**	PHYSIQUE DE LA MATIERE
J.M.	**PINON**	INGENIERIE DES SYSTEMES D'INFORMATION
D.	**PLAY**	CONCEPTION ET ANALYSE DES SYSTEMES MECANIQUES
J.	**POUSIN**	MODELISATION MATHEMATIQUE ET CALCUL SCIENTIFIQUE
P.	**PREVOT**	GROUPE DE RECHERCHE EN APPRENTISSAGE, COOPERATION ET INTERFACES MULTIMODALES
R.	**PROST**	CREATIS***
M.	**RAYNAUD**	CENTRE DE THERMIQUE
J.M.	**REYNOUARD**	UNITE DE RECHERCHE EN GENIE CIVIL
E.	**RIEUTORD** (Porf. Emérite)	MECANIQUE DES FLUIDES
J.	**ROBERT-BAUDOUY** (Mme)	GENETIQUE MOLECULAIRE DES MICROORGANISMES
D.	**ROUBY**	GEMPPM*
P.	**RUBEL**	INGENIERIE DES SYSTEMES D'INFORMATION
C.	**RUMELHART**	MECANIQUE DES SOLIDES
J.F.	**SACADURA**	CENTRE DE THERMIQUE
H.	**SAUTEREAU**	MATERIAUX MACROMOLECULAIRES
S.	**SCARVARDA**	AUTOMATIQUE INDUSTRIELLE
D.	**THOMASSET**	AUTOMATIQUE INDUSTRIELLE
M.	**TROCCAZ**	GENIE ELECTRIQUE ET FERROELECTRICITE
R.	**UNTERREINER**	CREATIS***
J.	**VERON**	LAEPSI**
G.	**VIGIER**	GEMPPM*
A.	**VINCENT**	GEMPPM*
P.	**VUILLERMOZ**	PHYSIQUE DE LA MATIERE

Directeurs de recherche C.N.R.S.

Y.	**BERTHIER**	MECANIQUE DES CONTACTS
P.	**CLAUDY**	THERMODYNAMIQUE APPLIQUEE
N.	**COTTE-PATTAT** (Mme)	GENETIQUE MOLECULAIRE DES MICROORGANISMES
P.	**FRANCIOSI**	GEMPMM
J.F.	**GERARD**	MATERIAUX MACROMOLECULAIRES
M.A.	**MANDRAND** (Mme)	GENETIQUE MOLECULAIRE DES MICROORGANISMES
J.F.	**QUINSON**	GEMPMM
A.	**ROCHE**	MATERIAUX MACROMOLECULAIRES

Directeurs de recherche I.N.R.A.

G.	**BONNOT**	BIOLOGIE APPLIQUEE
G.	**FEBVAY**	BIOLOGIE APPLIQUEE
S.	**GRENIER**	BIOLOGIE APPLIQUEE
Y.	**MENEZO**	BIOLOGIE APPLIQUEE

Directeurs de recherche I.N.S.E.R.M.

A.F.	**PRINGENT** (Mme)	BIOCHIMIE ET PHARMACOLOGIE
I.	**MAGNIN** (Mme)	CREATIS***

GEMPMM* : Groupe d'etude metallurgie physique et physique des matériaux
LAEPSI** : Laboratoire d'analyse environnementale des procédés et systèmes industriels
CREATIS*** : Centre de recherche et d'applications en traitement de l'image et du signal

REMERCIEMENTS

Je remercie chaleureusement Messieurs les membres du Jury : Mr O. Fayet, Mr C. Gautier, Mr P. Lejeune, Mr P. Nardon, Mr G. Riba et Mr T. Rigaud, d’avoir accepté de consacrer de leur temps pour juger ce travail.

Je remercie tout particulièrement Paul Nardon qui a non seulement été pour moi un Professeur (depuis 1989) mais aussi un directeur de DEA, puis de Thèse, toujours disponible et efficace. Je le remercie pour toute la confiance et la liberté qu'il m'a accordées au cours de ces quelques années de travail dans son laboratoire.

Je remercie Aziz Heddi, mon "second chef", et surtout mon ami, pour son encadrement enthousiaste et généreux.

Je remercie tous les membres du Laboratoire de Biologie de l'INSA, Christianne Nardon (Dissectrice), Josette Guillot (Electrophorisatrice), Annie Grenier (Charançoneuse), Chaqué Khatchadourian (Biomolécullariste) et tous les autres qui m'en voudront certainement de ne pas les avoir cités, pour leur aide, leur sympathie et l'acueil qu'il mon réservé dès mon arrivée au Laboratoire.

Je remercie tous les membres du Laboratoire de Génétique Moléculaire des Microorganismes et des Interactions Cellulaires de l'INSA, Guy Condemine, William Nasser, Sylvie Pescheux et les autres, de leur collaborations et de leur patience pour répondre à mes innombrables questions.

je remercie tous les membres de l'équipe du Pr. Gauthier du Laboratoire de Génétique et Biologie des Populations de l'Université Claude Bernard Lyon I, et tout particulièrement Dominique Mouchiroud et Nicolas Galtier pour leur collaboration fructueuse et amicale.

Je remercie enfin ma femme Sandrine et mon fils Jeremy pour leur aide à la fois physique et morale.

A Sandrine et à Jeremy

SOMMAIRE

Sommaire 8
INTRODUCTION 12
PARTIE A 15
étude bibliographique 15
A.1. Généralités sur La symbiose 16
A.2. *Sitophilus oryzae*, un modèle d'endo-cytobiose intégrée : Description du symbiocosme 18
A.2.1. Description de la composante insecte 18
A.2.2. Description de la composante bactérienne 20
A.3. Endocytobiose et évolution 21
A.3.1. Théorie de l'évolution par endosymbioses successives 21
A.3.2. Interactions génétiques entre l'hôte et ses endocytobiotes 21
A.3.3. Évolution des endocytobiotes 23
A.3.3.1. Évolution de la taille du génome des endocytobiotes 23
A.3.3.2. Évolution de la composition en C+G de l'ADN des endocytobiotes .. 24
A.3.3.3. Conclusion : le génome de *Buchnera aphidicola* 29
A.4. Intervention des endocytobiotes dans le métabolisme de leurs hôtes 30
A.4.1. Utilisation d'éléments inorganiques (Sulfate, CO_2 et azote atmosphérique) .. 30
A.4.2. Fourniture de vitamines et de facteurs de croissance 31
A.4.3. Intervention des endocytobiotes dans le métabolisme des lipides 32
A.4.4. Intervention des endocytobiotes dans le métabolisme des acides aminés 32
A.4.5. Conclusion : participation des endocytobiotes à l'adaptation de l'hôte aux variations du milieu 33
A.5. Une protéine de stress impliquée dans l'endocytobiose : la protéine Hsp60. 35
A.5.1. Principales propriétés biochimiques des protéines Hsp60 36
A.5.1.1. Structure biochimique du complexe GroE 36
A.5.1.2. Rôle physiologique du complexe GroE 37
A.5.1.3. Un modèle d'action pour le complexe GroE 38
A.5.1.4. L'équipe chaperon de la cellule bactérienne : rôle dans la biosynthèse des protéines 40
A.5.2. Régulation de l'expression des gènes *hsp60* 41
A.5.3. Les protéines Hsp60 des bactéries intra-cellulaires et des endocytobiotes 44
A.5.3.1. Rôle des protéines Hsp60 dans les relations hôte-endocytobiotes 44
A.5.3.2. Régulation des gènes *hsp60* chez les bactéries intracellulaires 46

PARTIE B 48
MATÉRIEL ET MÉTHODES 48
B.1. Élevage des charançons et souches utilisées 49
B.2. Purification des endocytobiotes de *Sitophilus oryzae* 49
B.3. Techniques biochimiques 50
B.3.1. Immunohistochimie sur coupes microscopiques 50
B.3.2. Dosage ELISA 50
B.3.3. Chromatographie sur DEAE-cellulose 51
B.3.3.1. Préparation des échantillons 51
B.3.3.2. Préparation de la colonne 52
B.3.3.3. Chromatographie 52
B.3.4. Chromatographie liquide à haute performance (HPLC) 52
B.3.4.1. Préparation des échantillons d'ADN 53
B.3.4.2. Hydrolyse chimique 53
B.3.4.3. HPLC 53
B.3.5. Electrophorèse 54
B.3.5.1. Electrophorèse monodirectionnelle (SDS-PAGE) 54
B.3.5.1.1. PRÉPARATION DES ÉCHANTILLONS 54
B.3.5.1.2. PRÉPARATION DES GELS D'ACRYLAMIDE 54
B.3.5.1.3. CONDITIONS D'ÉLECTROPHORÈSE 55
B.3.5.1.4. COLORATION AU BLEU DE COOMASSIE 55
B.3.5.1.5. COLORATION À L'ARGENT (BLUM *ET AL.*, 1987) 55
B.3.5.2. Electrophorèse bidimensionnelle (IEF - SDS PAGE) 55
B.3.5.2.1. PRINCIPE 55
B.3.5.2.2. PRÉPARATION DES ÉCHANTILLONS 56
B.3.5.2.3. ISOÉLECTROFOCALISATION 56
B.3.5.2.4. ÉQUILIBRATION 56
B.3.5.2.5. DEUXIÈME DIMENSION (SDS-PAGE) 56
B.3.5.3. Western blot 56
B.3.5.3.1. MARQUAGE IMMUNOLOGIQUE 56
B.3.5.3.2. MARQUAGE DES PROTÉINES NÉOSYNTHÉTISÉES 57
B.3.5.3.2.1. Marquage des larves 57
B.3.5.3.2.2. Marquage des bactériomes et des endocytobiotes isolés 57
B.3.5.3.2.3. Révélation des gels par fluorographie 58
B.3.6. Phosphorylation des protéines *in vivo* 58
B.4. Techniques de biologie moléculaire 58
B.4.1. Souches bactériennes et plasmides utilisés 58
B.4.2. Conditions de culture et de conservation des souches 59
B.4.3. Extraction d'ADN plasmidique 59

B.4.4. Digestion, ligature, électrophorèse et isolement des brins d'ADN 60
B.4.4.1. Digestion par des enzymes de restriction 60
B.4.4.2. Ligature des brins d'ADN 60
B.4.4.3. Electrophorèse en gel d'agarose 61
B.4.4.4. Isolement d'un fragment d'ADN 61
B.4.5. Introduction d'ADN plasmidique dans une bactérie 62
B.4.5.1. Transformation 62
B.4.5.2. Electroporation 62
B.4.6. Amplification de fragments d'ADN chromosomique par PCR 63
B.4.7. Clonage des fragments de PCR 63
B.4.8. Séquençage de l'ADN 64
B.4.8.1. Principe de la méthode 64
B.4.8.2. Préparation de l'ADN pour le séquençage 65
B.4.8.3. Réaction de séquençage 65
B.4.8.4. Electrophorèse et autoradiographie 66
B.4.9. Techniques d'hybridation moléculaire 66
B.4.9.1. Southern Blot (ADN) 66
B.4.9.1.1. EXTRACTION DE L'ADN CHROMOSOMIQUE DES ENDOCYTOBIOTES 66
B.4.9.1.2. TRANSFERT DE L'ADN SUR MEMBRANE DE NYLON 66
B.4.9.1.3. PRÉPARATION DES SONDES RADIOACTIVES 67
B.4.9.1.4. HYBRIDATION ET AUTORADIOGRAPHIE 67
B.4.9.2. Northern blot (ARN) 68
B.4.9.2.1. EXTRACTION DE L'ARN DES LARVES DE CHARANÇONS ET DES ENDOCYTOBIOTES 68
B.4.9.2.2. ÉLECTROPHORÈSE EN CONDITION DÉNATURANTE 68
B.4.9.2.3. TRANSFERT ET HYBRIDATION 69
B.5. Electrophorèse en champS pulséS 69
B.5.1. Préparation des échantillons 69
B.5.2. Digestion enzymatique 70
B.5.3. Electrophorèse et coloration des gels 70
B.6. Analyse des séquences d'ADN et des séquences protéiques 70
B.6.1. Recherche des séquences 70
B.6.2. Alignement et phylogénie 71
PARTIE C 72
RESULTATS ET DISCUSSION 72
C.1. Aspects moléculaires des endo-cytobiotes de *Sitophilus oryzae* 73
C.1.1. Origine phylogénétique des endocytobiotes de *Sitophilus oryzae* 73
C.1.2. Détermination de la taille du génome des endocytobiotes de *Sitophilus oryzae* 76

C.1.2.1. Électrophorèse en champs pulsés : analyse de restriction..... 76
C.1.2.2. Digestion de l'ADN des endocytobiotes par *I-ceu I*..... 78
C.1.3. Mesure du taux de C+G de l'ADN des endocytobiotes de *Sitophilus oryzae*.. 79
C.1.4. Discussion..... 81
C.2 Étude des interactions moléculaires entre le charançon *Sitophilus oryzae* et sa principale bactérie symbiotique..... 87
C.2.1. Comparaison des profils électrophorétiques des souches symbiotique et aposymbiotique de *Sitophilus oryzae* 87
C.2.2. Étude de la protéine Hsp60 des endocytobiotes de *Sitophilus oryzae*..... 91
C.2.2.1. Caractérisation immunologique de la protéine Hsp60 des endocytobiotes de *Sitophilus oryzae* 91
C.2.2.2. Purification de la protéine Hsp60 des endocytobiotes de *Sitophilus oryzae* 94
C.2.2.3. Clonage et séquençage du gène codant la protéine Hsp60 97
C.2.2.4. Etude de l'expression du gène *hsp60* des endocytobiotes de *Sitophilus oryzae* 101
C.2.2.4.1. Comparaison de l'expression protéique *in vitro* et *ex vivo* des endo-cytobiotes des larves de *Sitophilus oryzae*..... 101
C.2.2.4.2. Étude de l'effet d'un traitement thermique sur l'expression du gène *hsp60* des endocytobiotes des larves de *Sitophilus oryzae*..... 105
C.2.3. Discussion..... 108
PARTIE D..... 111
CONCLUSION ET PERSPECTIVES..... 111
D.1. Conclusion et perspectives..... 112
PARTIE E..... 117
RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES..... 117
Liste des travaux et communications de l'auteur 133

INTRODUCTION

"Mutualistic interactions, although important ecologically, are unlikely to be an important driving force for evolutionary change"

Evolutionary genetics
(Maynard-Smith, 1989a)

Cette phrase, écrite de la main d'un généticien de renom international, a sans doute courroucé un bon nombre de symbiologistes. Elle illustre néanmoins un des aspects les plus paradoxaux de l'étude de la symbiose : bien que l'association symbiotique apparaisse maintenant comme une règle quasi universelle en biologie, elle a toujours conservé son image de "simple curiosité biologique" au sein de la communauté scientifique.

Cette étude concerne la symbiose chez le charançon des céréales *Sitophilus oryzae* (Coléoptère, Curculionidae), redoutable ravageur des céréales stockées et en plein champ. Quatre thèses sur cet insecte ont déjà été réalisées au laboratoire de biologie appliquée de l'INSA de Lyon (Nardon, 1978 ; Wicker, 1984 ; Gasnier-Fauchet, 1985 ; Heddi, 1990). Ces travaux ont permis de mettre en évidence le rôle métabolique des symbiotes sur la physiologie de l'insecte et de définir ainsi la notion de symbiocosme pour caractériser la nouvelle entité biologique issue de la symbiose (Nardon et Grenier, 1993). Le développement de la biologie moléculaire au laboratoire nous permet maintenant d'étudier de plus près la structure du symbiocosme, c'est-à-dire les interactions entre les génomes associés.

La formation du symbiocosme ne s'est pas faite d'un coup. On peut logiquement penser qu'elle résulte d'une coadaptation et d'une coévolution entre les associés. Le résultat en est le plus souvent la perte d'indépendance des partenaires. La symbiose peut donc s'interpréter comme un mécanisme sophistiqué d'acquisition de nouveaux gènes qui vont permettre une meilleure exploitation du substrat alimentaire (fourniture de vitamines et d'acides aminés notamment). Toutefois, le nouveau génome associé ne va pas simplement coexister avec le premier, des interactions nécessaires au mécanisme d'intégration vont se produire. C'est ce que nous souhaitons analyser dans cette thèse.

Après cette introduction générale, une analyse bibliographique du sujet sera proposée. Le modèle d'étude *Sitophilus oryzae* sera tout d'abord présenté, puis les différents niveaux d'intervention de l'endocytobiose dans l'évolution et le métabolisme des organismes seront discutés. Enfin, nous aborderons la question de la participation de la protéine de stress Hsp60 dans les mécanismes d'interaction hôte/endocytobiotes.

Les résultats présentés dans ce travail concernent d'une part la caractérisation moléculaire des endocytobiotes de *Sitophilus oryzae* (position phylogénétique, taille du génome et taux de C+G de l'ADN), et d'autre part l'étude des interactions moléculaires entre le charançon et ses bactéries symbiotiques. Nous verrons ainsi comment la protéine Hsp60 peut être impliquée dans ces mécanismes d'interactions. L'ensemble de ces résultats sera finalement discuté dans ce contexte d'évolution particulier que représente le symbiocosme.

Pour ne pas terminer cette introduction sur le ton qui l'avait initiée, nous citerons une autre phrase de Maynard-Smith écrite quelques mois plus tard. Elle est tirée d'un article de la revue Nature à propos du congrès "Symbiosis as a source of Evolutionary Novelty" qui s'était tenu à Bellagio (Italie) en juin 1989. Ce jour-là, les symbiologistes avaient gagné une bataille...

"... it is already clear that, by bringing together genetic material from distantly related ancestors, symbiosis provides a source of evolutionary novelty that is additional to mutation and homologous genetic recombination".

Nature
(Maynard-Smith, 1989b)

PARTIE A

ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE

A.1. GENERALITES SUR LA SYMBIOSE

C'est le lichénologue Franck, en 1877, qui définit pour la première fois le terme de symbiose (cité dans Sapp, 1991). Deux années plus tard, De Bary (1879) précise ce concept : "le parasitisme, le mutualisme, le lichénisme sont chacun un cas spécial de cette tendance à l'association pour laquelle le terme symbiose est proposé comme désignation générale". Au début du XX^{ème} siècle, l'importance de la symbiose fut reconnue par quelques auteurs (Portier, 1918 ; Mereschkowski, 1920 ; Wallin, 1927) qui postulèrent l'origine symbiotique de la cellule eucaryote. Toutefois, insuffisamment argumentée, cette théorie sombra bientôt dans l'oubli. Il fallut attendre 1965 pour que Buchner, professeur à l'Université de Munich, relance l'intérêt pour la symbiose grâce à son célèbre ouvrage "Endosymbiosis of Animals with plants and microorganisms"(1) . Depuis, et grâce au développement de la biologie moléculaire qui fournit les preuves de l'origine symbiotique des plastes et des mitochondries (Gray, 1989, 1993), de très nombreux ouvrages ont été publiés (cités dans Nardon et Grenier, 1993).

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 *Macrotermes darwiniensis* (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 symbiotes permet également de distinguer plusieurs formes de symbioses. L'ectosymbiose correspond à une relation où les deux partenaires sont extérieurs l'un à l'autre. Les exemples des lichens (Fricke, 1975), des fourmis et des termites champignonnistes (Wood et Thomas, 1989) ou du couple poisson clown - anémone de mer (Frank, 1995), montrent la diversité de ce genre d'association. L'endosymbiose est une relation dans laquelle les symbiotes sont à l'intérieur de leur hôte, généralement dans le tube digestif comme c'est le cas chez les termites (Grassé et Noirot, 1959) et chez les ruminants (Grain, 1967), ou dans une poche spécialisée à l'exemple de l'organe bioluminescent de certains poissons (Haygood et Distel, 1993). Finalement, l'endocytobiose caractérise une symbiose intracellulaire. Les symbiotes (appelés endocytobiotes) peuvent être des virus comme chez la drosophile (Thomas-Orillard, 1990), des bactéries comme chez les mollusques (Fiala-Medioni, 1988), chez les cloportes

(1) En fait 1965 est la date de la version anglaise de l'ouvrage allemand de Buchner (1953) intitulé "Endosymbiose der Tiere mit pflanzlichen Mikroorganismen".

(Rousset *et al.*, 1992a) ou chez de nombreux insectes (Buchner, 1965 ; Nardon, 1988 ; Nardon et Grenier, 1993), ou encore des levures comme chez les Cerambycidae (Riba, 1977) ou chez les Anobiidae (Schwemmler et Gassner, 1989).

Enfin, les différentes symbioses ont été classées en fonction de leur "niveau d'association" en terme d'interactions et de transmission des symbiotes à la descendance. Le tableau A.1.1 présente les cinq niveaux d'association avec leurs principales caractéristiques.

Tableau A.1.1 (d'après Nardon et Grenier, 1993) : Principales caractéristiques et exemples des cinq niveaux d'association dans la symbiose.

	Symbiose antagoniste	Symbiose primaire	Symbiose secondaire	Endocytobiose intégrée	Symbiose organogénétique
% de population concernée	Faible	< 100 %	100 %	100 %	100 %
Fitness de l'hôte	-	±	+	+	+
Localisation des symbiotes	non localisés	non localisés	localisés (structures spécialisées)	intracellulaires	intracellulaires
Transmission des symbiotes	le plus souvent horizontale	horizontale ou verticale	Horizontale (à partir du milieu)	verticale	verticale
Exemples	*Mycoplasma*	*Rickettsia et Wolbachia*	bactéries du rumen	symbiotes du puceron et du charançon	mitochondries et chloroplastes

Les exemples présentés précédemment montrent que l'association symbiotique est un phénomène très diversifié et surtout très fréquent en biologie. Les symbiologistes s'interrogent même sur l'existence d'individus non symbiotiques. C'est ce que Nardon et Grenier (1993) définissent en ces termes : "la tendance à l'association (plus ou moins intime) est une loi biologique fondamentale, plus généralement même une loi de nature".

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). Une meilleure compréhension des mécanismes d'interaction hôte/symbiotes permettrait peut-être d'envisager le développement de nouveaux moyens de lutte contre les ravageurs.

A.2. *Sitophilus oryzae*, UN MODELE D'ENDO-CYTOBIOSE INTEGREE : DESCRIPTION DU SYMBIOCOSME

A.2.1. Description de la composante insecte

Le genre *Sitophilus* appartient à la famille des Curculionidae ; c'est la plus grande famille de Coléoptères (environ 50 000 espèces), et même la plus grande famille d'insectes (Perrin, 1991). Ce genre a été particulièrement étudié au laboratoire, et notamment les trois espèces inféodées aux céréales *Sitophilus oryzae*, *Sitophilus granarius* et *Sitophilus zeamais* en raison de leur extraordinaire potentiel de destruction des céréales entreposées (Laviolette et Nardon, 1963 ; Grenier *et al.*, 1986). *Sitophilus oryzae* et *Sitophilus zeamais* sont rencontrés sous toutes les latitudes, l'espèce *Sitophilus granarius* est par contre plus septentrionale.

Ces trois espèces présentent des cycles de développement similaires : les femelles pondent leurs oeufs à l'intérieur des grains de blé dans un trou perforé par le rostre. Ce trou est ensuite rebouché par une sécrétion mucilagineuse de l'oviducte qui durcit rapidement à l'air (Nardon, 1963). Le développement de la larve (quatre stades larvaires et un stade nymphal) jusqu'au stade adulte, se déroule à l'intérieur du grain en 31 jours environ à 27,5°C pour les souches symbiotiques. Le grain de céréale apporte à l'insecte à la fois sa nourriture et sa protection. Après la mue imaginale, l'adulte reste un à deux jours dans le grain avant l'émergence.

Chez la larve, on trouve des endocytobiotes dans des cellules spécialisées (bactériocytes), elles-mêmes regroupées en un organe appelé bactériome (Pierantoni, 1927 ; Mansour, 1930 ; Musgrave, 1964 ; Nardon, 1971). Cet organe en forme de collier bilobé (Figure A.1.1) est localisé à la jonction du stomodeum et du mésentéron, mais ne possède pas de connexion avec le tube digestif. Au cours des quatre stades larvaires, la taille du bactériome augmente (Lum et Baker, 1973) et Nardon (1978) a estimé à environ 3.10^6 le nombre de bactéries par bactériome chez les larves de quatrième stade de *Sitophilus oryzae*.

Pendant la nymphose, à partir du moment où la larve cesse de s'alimenter, le bactériome se désintègre et libère les bactériocytes dont une partie va dégénérer et l'autre va s'insinuer entre l'intestin imaginal en cours de formation et sa tunique musculaire (Nardon et Wicker, 1981). Ainsi, chez l'adulte, les endocytobiotes sont présents à l'apex des caeca mésentériques (Figure A.1.1). Très abondants chez les jeunes imagos, ils disparaissent chez les individus plus âgés (Mansour, 1930 ; Nardon et Wicker, 1981).

A partir de la troisième semaine, les endocytobiotes ne sont présents que dans les cellules de la lignée germinale des femelles qui les transmettent ainsi à leur descendance. Ils sont localisés dans des bactériomes à l'apex des ovarioles, mais sont également présents dans les ovocytes et

dans les trophocytes. Dans les oeufs, ils gisent librement dans le cytoplasme et sont particulièrement nombreux au pôle postérieur en contact avec l'oosome (Nardon, 1971 ; Nardon *et al.*, 1985 ; Nardon et Grenier, 1988).

Les endocytobiotes n'ont jamais été identifiés dans les testicules des adultes. Ils sont éliminés de la lignée germinale mâle selon des modalités pour le moment encore inconnues (Nardon et Wicker, 1981). Il est important de souligner que la transmission des endocytobiotes se fait donc par un processus d'hérédité cytoplasmique, au même titre que celle des mitochondries, et ne requiert aucun mécanisme particulier de recontamination des descendants.

L'un des principaux avantages du modèle *Sitophilus oryzae* provient de l'obtention au laboratoire d'une souche aposymbiotique par traitement à la chaleur (35°C) et sous forte l'humidité relative (90 %) (Nardon, 1973). En effet, la rupture d'une relation symbiotique de type "endocytobiose intégrée" est un phénomène extrêmement rare. Généralement les partenaires engagés dans la relation symbiotique deviennent totalement dépendants l'un de l'autre et ne peuvent survivre seuls comme c'est le cas chez l'amibe (Jéon, 1983) ou chez le puceron (Ishikawa, 1989a).

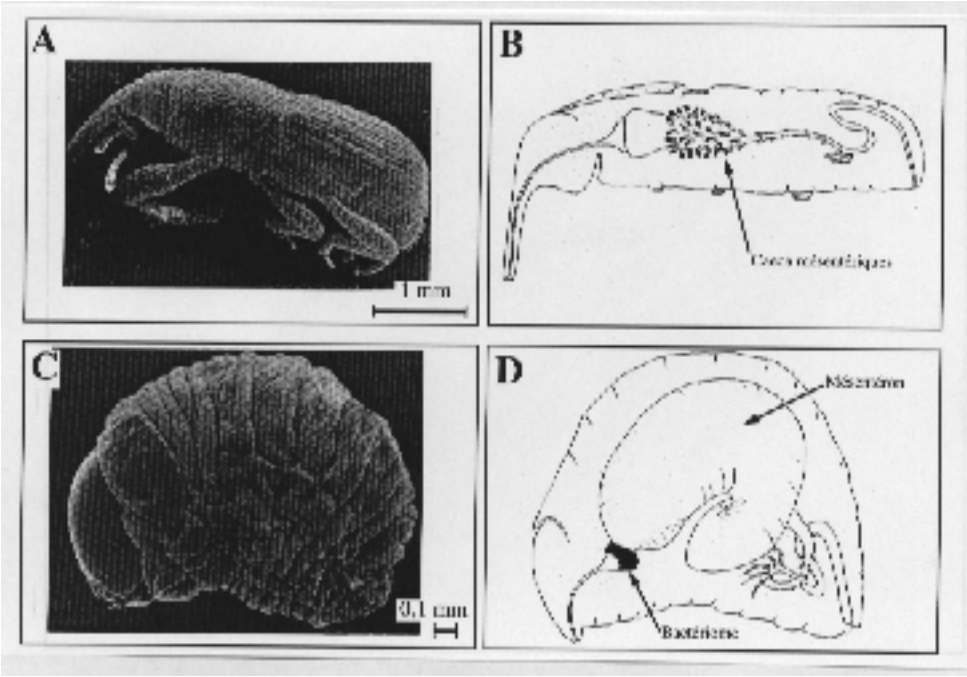


Figure A.1.1 : Photos d'un adulte mâle (A) et d'une larve de quatrième stade (C) de *Sitophilus oryzae* prises en microscopie électronique ; (B) et (D) schéma des coupes correspondantes.

A.2.2. Description de la composante bactérienne

C'est Pierantoni, en 1927, qui a le premier décrit le bactériome larvaire dans le genre *Sitophilus*. Chez *Sitophilus oryzae*, les travaux de Mansour (1930, 1934, 1935), Scheinert (1933), Musgrave *et al.* (1962), Murray et Tiegs (1935), Musgrave et Miller (1953) et Nardon (1978) sont consacrés à l'étude de ces bactéries symbiotiques. Ce sont des bactéries bacilliformes plus ou moins flexueuses de 5 à 30 µm de longueur qui se présentent fréquemment sous forme de chaînettes. Les endocytobiotes n'ont pas de flagelle, mais ils présentent des mouvements de torsion plus ou moins rapides et très visibles au microscope à contraste de phase. Cette caractéristique permet d'estimer facilement la viabilité de ces microorganismes en milieu de culture. Enfin, il faut noter que ces bactéries gisent librement dans le cytoplasme de l'hôte et ne sont pas entourées d'une vacuole. Leur enveloppe est constituée d'une membrane plasmique tri-lamellée et d'une paroi externe également tri-lamellée et riche en polysaccharides, ce qui confère à ces endocytobiotes une structure de bactérie Gram négative (Stanier *et al*., 1976 ; Nardon, 1971).

Chez *Sitophilus zeamais* les symbiotes sont par contre nettement spiralés et il existe vraisemblablement deux populations d'endocytobiotes (Dasch *et al.*, 1984 ; Campbell *et al.*, 1992). L'existence d'une double population d'endocytobiotes n'est pas exclue chez *Sitophilus oryzae*, puisque deux séquences très proches de gènes codant l'ARN ribosomal 16S ont été amplifiées sur cette souche (Heddi, communication personnelle) et qu'une forme très minoritaire de symbiotes spiralés a été observée par hasard dans une souche du laboratoire (De la Chapelle, communication personnelle).

La culture des endocytobiotes de *Sitophilus oryzae* a été tentée par plusieurs auteurs (Musgrave et McDermott, 1961 ; Nardon, 1978) mais aucun résultat fiable n'a pu être obtenu à ce jour. Ainsi, la taxonomie de cette bactérie Gram négative non ciliée et non sporulante n'est-elle toujours pas clairement définie. La difficulté de culture des endocytobiotes n'est pas propre au modèle *Sitophilus*, puisque jusqu'à présent aucune bactérie symbiotique intracellulaire n'a pu être cultivée de façon certaine en laboratoire (Ishikawa, 1989b).

Enfin des résultats très récents ont montré que la plupart des souches de *Sitophilus oryzae* du laboratoire possèdent une autre bactérie intracellulaire apparentée au groupe des *Wolbachia* (Heddi, communication personnelle). Ces bactéries sont localisées dans l'ensemble des tissus de l'insecte y compris dans les bactériomes larvaire et ovarien. L'intervention des *Wolbachia* dans le métabolisme de l'hôte est encore très mal connue même sur les autres modèles de symbiose à *Wolbachia*. Des résultats préliminaires montrent que leur élimination entraîne peu de modifications physiologiques sur l'insecte (poids et temps de développement). Par contre, il apparaît que ces bactéries peuvent modifier la fertilité des individus contaminés (Heddi, communication personnelle).

A.3. ENDOCYTOBIOSE ET EVOLUTION

A.3.1. Théorie de l'évolution par endosymbioses successives

Chez les unicellulaires, l'acquisition d'un endocytobiote (par phagocytose) est un événement de première importance puisque tout l'organisme et sa descendance se trouvent subitement modifiés. D'après la théorie de l'évolution par endosymbioses successives énoncée de façon précise par Lynn Margulis (1993), la cellule eucaryote est un assemblage de cellules procaryotes intégrées successivement au cours de l'évolution. Ainsi, le noyau (Lake et Rivera, 1994), les microtubules (Takhtajan cité dans Margulis, 1981) et surtout les mitochondries et les chloroplastes (Gray, 1989) seraient d'anciennes bactéries symbiotiques parfaitement intégrées dans leur cellule hôte.

Par contre, chez les pluricellulaires, la symbiose n'a véritablement d'importance évolutive que si les cellules germinales sont contaminées. L'intégration d'un symbiote peut se faire selon deux modalités ; la première correspond au cas où la bactérie symbiotique est une bactérie du tube digestif. Celle-ci va peu à peu être intégrée par l'hôte dans des cellules épithéliales par exemple, puis dans les cellules germinales (les mécanismes de cette contamination restent toutefois problématiques). Selon la deuxième modalité, la bactérie symbiotique est une bactérie parasite qui envahit l'hôte (et ses cellules germinales). Elle est ensuite "domestiquée" et refoulée vers un organe spécialisé ou encapsulée dans des vacuoles. Cette hypothèse a été initialement formulée par Paillot en 1933, et a très bien été illustrée par la symbiose accidentelle de l'amibe (*Amoeba proteus*) étudiée par le Professeur Jéon (1983). Selon le premier processus, l'avantage sélectif induit par les bactéries est présent avant l'intégration. Dans le second cas, c'est exactement l'inverse puisque l'invasion a tout d'abord un effet délétère sur l'hôte avant de lui être bénéfique. Quel que soit le mode de contamination, il est indéniable que pour un organisme pluricellulaire l'intégration d'un endocytobiote correspond à l'acquisition soudaine d'un grand nombre de gènes, organisés et régulés, capables d'effectuer certaines fonctions métaboliques bien précises. L'endocytobiote apparaît alors comme un "kit de gènes" prêt à l'emploi et transmissible de façon très efficace à sa descendance (Nardon et Grenier, 1993 ; Nardon, 1995).

A.3.2. Interactions génétiques entre l'hôte et ses endocytobiotes

Dans les relations de type hôte-parasitoïdes, la production de nouvelles protéines dans l'hémolymphe de l'insecte parasité a été montrée chez *Heliothis virescens* parasité par la guêpe *Campoletis sonorensis* (Cook *et al.*, 1994), chez *Manducta sexta* parasité par une autre guêpe

Cortesia congregata (Beckage *et al.*, 1987), et enfin plus récemment chez le lépidoptère *Trichoplusia ni* parasité par la guêpe *Chelonus curvimaculatus* (Soldevila et Jones, 1994). Chez *Trichoplusia ni* une protéine de 185 kDa synthétisée par l'hôte en réponse à la présence du parasite a pu être caractérisée.

Chez l'amibe au moins quatre protéines d'interactions ont été mises en évidence. L'une de ces protéines est synthétisée exclusivement par la souche aposymbiotique d'*Amoeba proteus* et son rôle n'est pas déterminé (Jéon, communication personnelle). Les trois autres (Xd29, GroELx et Xd96) sont d'origine procaryotique (Jéon, 1995). La protéine Xd29 est exportée massivement dans le cytoplasme hôte et son rôle n'est pas déterminé. La protéine GroEL est surexprimée dans les endocytobiotes en réponse au stress intracellulaire. Enfin, la protéine Xd96 semble impliquée dans les mécanismes d'inhibition de la fusion membranaire des lysosomes avec les symbiosomes.

Chez le charançon *Sitophilus oryzae,* Nardon (1978) a montré que l'insecte contrôle à la fois le nombre et la localisation de ses endocytobiotes. De plus, des rétrocroisements successifs entre femelles aposymbiotiques et mâles symbiotiques (permettant le transfert du génome symbiotique dans un individu aposymbiotique) aboutissent, en quelques générations, à une baisse drastique de la fertilité et à un allongement de la durée de développement des individus. Ces résultats montrent que le génome nucléaire des insectes symbiotiques ne peut pas fonctionner sans ses bactéries et donnent ainsi la preuve de l'existence d'interactions génétiques entre l'hôte et ses endocytobiotes. Il est important de noter que, chez tous les Rhynchophorinae et chez la plupart des insectes, la différentiation des bactériocytes en cellules géantes et polyploïdes est directement liée à la présence des endocytobiotes (Mansour, 1934 ; Nardon, 1971, 1988). Ainsi, les individus aposymbiotiques de *Sitophilus oryzae* n'ont pas de bactériome (Nardon, 1978) et chez *Sitophilus granarius* des ébauches de bactériomes persistent chez les aposymbiotiques mais les noyaux des cellules restent de petite taille (Mansour, 1934). Des observation similaires ont été faites chez la blatte par Brooks et Richards (1955).

Dans les endocytobioses primaires à *Wolbachia,* les endocytobiotes sont très souvent responsables de phénomènes d'incompatibilités nucléocytoplasmiques partielles ou totales (Breeuwer et Werren, 1990). Chez *Drosophila simulans* et *Drosophila melanogaster,* les croisements entre femelles aposymbiotiques et males symbiotiques sont quasi stériles (O'Neill et Karr, 1990 ; Solignac *et al.*, 1994).

Chez le cloporte *Armadillidium vulgare*, le déterminisme du sexe est chromosomique mais également lié à la présence d'une endocytobiose à *Wolbachia*. Les mâles génétiques sont (ZZ) et les femelles sont (ZW), mais lorsqu'un mâle génétique (ZZ) est infecté par une *Wolbachia*, il se transforme en femelle. Un gène F de *Wolbachia,* non caractérisé, semble responsable de cette féminisation. Juchault *et al.* (1992) ont alors émis l'hypothèse que le chromosome W des femelles pourrait être un chromosome Z ayant intégré de façon stable le gène procaryote F responsable de la féminisation.

Enfin chez les trichogrammes, les endocytobiotes (*Wolbachia*) sont capables d'induire une reproduction parthénogénétique chez les femelles infectées. Ainsi, les femelles symbiotiques ne produisent que des femelles symbiotiques homozygotes en l'absence de fécondation. L'élimination des symbiotes par traitement aux antibiotiques permet de rétablir la reproduction sexuée (Stouthamer *et al.*, 1990 ; Louis *et al.*, 1993 ; Pintureau *et al.*, 1993).

A.3.3. Évolution des endocytobiotes

Les bactéries intracellulaires obligatoires (parasites ou endocytobiotes) forment des populations tout à fait à part de celles des bactéries dites libres. Du fait de la très grande difficulté à les cultiver, peu d'études leur ont été consacrées et leur taxonomie est souvent mal définie. La première partie de ce travail étant entièrement vouée à la caractérisation moléculaire des endocytobiotes de *Sitophilus oryzae*, il nous a paru intéressant de faire le point sur les quelques aspects caractéristiques de ces populations bactériennes.

A.3.3.1. Évolution de la taille du génome des endocytobiotes

Les génomes bactériens montrent une grande variabilité de taille. Herdman (1985) a montré qu'elle peut varier de 184 kb chez la cyanelle de *Cyanophora paradoxa* à plus de 13 Mb chez une souche de cyanobactérie, pour une moyenne globale d'environ 5 Mb.

Selon Maniloff (1996), l'évolution de la taille des génomes pourrait se faire grâce à deux processus évolutifs opposés, le premier appelé "bottom up" est un processus de complexification et le deuxième "top down" est un processus de simplification. La complexification des génomes, par duplications et intégrations de nouveaux gènes s'est, selon toute vraisemblance, déroulée depuis l'origine de la première molécule d'ARN jusqu'à la formation du protogénote (la première cellule). Ainsi, pour coloniser tous les milieux et pour faire face aux variations des conditions environnementales, des organismes possédant des nouvelles fonctions métaboliques (ou à des nouvelles régulations) ont été sélectionnés. A l'inverse, l'évolution par simplification, c'est à dire par délétions successives de gènes, s'effectue lorsqu'une population se retrouve isolée dans un milieu stable et sans compétition. La sélection opère alors en terme d'efficacité de réplication et de division. Les gènes délétés sont préférentiellement les gènes des voies métaboliques hautement régulés et évolués, et les gènes conservés sont les gènes non régulés des voies métaboliques primitives.

Très peu d'études ont été consacrées à la détermination de la taille des génomes des endocytobiotes. L'ensemble des données présentées dans le Tableau A.3.1 laisse néanmoins supposer que la plupart des bactéries intracellulaires ont suivi le schéma d'évolution par simplification, puisque toutes possèdent des génomes de taille relativement faible.

Tableau A.3.1 : Tailles des génomes de bactéries intracellulaires obligatoires estimées par électrophorèse en champs pulsés (PFGE), par cinétique de réassociation (CR) ou par séquençage (S). (*) Bactérie parasite intracellulaire cultivable en milieu complexe ; (**) Endocytobiote de protozoaire.

Organismes	Taille du génome	Références
Anaplasma marginale	1,2 Mb (PFGE)	(Alleman *et al.*, 1993)
Chlamydia trachomatis	1,4 Mb (PFGE)	(Frutos *et al.*, 1989)
Coxiella burnettii	1,6 Mb (PFGE)	(Heizen *et al.*, 1990)
cyanelle de *Cyanophora paradoxa* (**)	184 kb (CR)	(Herdman, 1985)
Haemophilus influenzae (*)	1,83 Mb (S)	(Fleischmann *et al.*, 1995)
lambda (**)	723 kb (CR)	(Herdman, 1985)
mu (**)	861 kb (CR)	(Herdman, 1985)
Mycoplasma spp.	0,78-1,3 Mb (PFGE)	(Krawiec et Riley, 1990)
omikron (**)	769 kb (CR)	(Herdman, 1985)
pi (**)	907 kb (CR)	(Herdman, 1985)
Rickettsia rickettsi	2,1 Mb (PFGE)	(Roux *et al.*, 1992)
Rickettsia spp.	1,1-1,3 Mb (PFGE)	(Roux *et al.*, 1992)
Rickettsiella spp.	1,72-2,1 Mb (PFGE)	(Krawiec et Riley, 1990)
xénosome (**)	523 kb (CR)	(Soldo *et al.*, 1983)

A.3.3.2. Évolution de la composition en C+G de l'ADN des endocytobiotes

La composition en C+G de l'ADN des procaryotes est relativement constante pour un même organisme mais varie grandement entre les espèces. Les taux de C+G s'étalent de 25 % chez *Mycoplasma capricolum* jusqu'à 75 % chez *Micrococcus luteus* (Normore et Brown, 1970). C'est pourquoi ce critère a longtemps été utilisé en taxonomie. Ce qui est plus remarquable, c'est que même la taxonomie moderne (Priest et Austin, 1993), basée essentiellement sur des critères phylogénétiques, reste corrélée au taux de C+G.

L'hypothèse la plus probable pour expliquer les variations des taux de C+G fait intervenir une pression de mutation directionnelle impliquant des taux de conversion différents, entre les paires de bases A:T et C:G (pression de CG) d'une part, et les paires de bases C:G et A:T (pression de AT) d'autre part (Sueoka, 1962, 1988, 1992, 1995 ; Osawa *et al.*, 1988). Selon ces auteurs, les mutations causées par cette pression de mutation directionnelle sont sujettes aux contraintes sélectives sur l'ADN. Les première et deuxième positions de l'ADN codant, par exemple, ne peuvent pas toujours être mutées sans provoquer d'effets délétères sur l'individu. La fixation des mutations non délétères, dans ce modèle neutraliste, se fait par dérive génétique de la population (Kimura, 1983). La corrélation entre phylogénie et taux de C+G des bactéries semble montrer que cette pression de mutation s'est exercée tout au long de l'évolution des bactéries (Muto et Osawa, 1987; Osawa *et al*., 1988).

Une autre hypothèse, formulée pour tenter d'expliquer les variations de C+G des organismes, fait intervenir un modèle de sélection à la fois positive et négative favorisant une certaine “composition optimale” de l’ADN adaptée aux conditions environnementales (Bernardi *et al.*, 1988 ; Bernardi, 1989). Selon ces auteurs, la température pourrait être un des facteurs susceptibles de générer cette sélection. En effet, il a été montré que l’augmentation du taux de C+G dans l’ADN codant augmente non seulement la stabilité de la molécule d’ADN, mais également celle des protéines codées en modifiant la fréquence de certains acides aminés. Ce modèle n’agirait pas au niveau de chaque base, mais plutôt à un niveau régional. Il est effectivement très peu probable qu'une mutation ponctuelle d'une base A ou T en une base G ou C puisse induire une variation de la température d'hybridation (ΔTm) de l'ADN assez importante pour être sélectionnée. Enfin, ce modèle a surtout été utilisé chez les eucaryotes, pour comprendre les variations de C+G au sein des grandes régions génomiques de l'ADN (isochores) et semble pour le moment réfuté chez les procaryotes. L'exemple de *Pyrococcus furiosus* (T_{opt} = 97°C ; C+G = 38%) montre effectivement l’existence de bactéries thermophiles à faibles taux de C+G (Galtier et Lobry, 1997).

Certains auteurs, sur la base de quelques exemples, ont suggéré que les bactéries intracellulaires (parasites obligatoires ou endocytobiotes) possèdent des taux de C+G faibles (Dasch *et al.*, 1984 ; Ohtaka et Ishikawa, 1993). De même, une accumulation de bases A et T a été décrite dans les régions codantes et non codantes des mitochondries d'insectes (Crozier et Crozier, 1993). Pour tenter de formuler plus précisément l’hypothèse de l'existence d'une pression de mutation AT liée aux conditions de vie intracellulaire, nous avons entrepris une étude plus systématique. Ce travail est axé sur l'analyse de trois critères : (1) les estimations globales des taux de C+G bactériens trouvés dans les quatre volumes du "*Bergey's Manual of Systematic bacteriology*" (Krieg et Holt, 1989) ; (2) les taux de C+G en position III (CGIII) des gènes codant la protéine bactérienne Hsp60[(1)] ; (3) les taux de C+G au niveau de l'ADN ribosomique 16S (CG16S)[(2)]. Seules les bactéries purement obligatoires, c’est-à-dire non-viables en milieu de culture, ont été considérées. Celles-ci peuvent être symbiotiques (en association mutualiste) ou parasites. Les taux de C+G des bactéries intracellulaires obligatoires ayant été recensés sont présentés dans le Tableau A.3.2.

---

(1) tirés de Genbank data base (Benson *et al.*, 1993)

(2) tirés de Genbank data base et SSU rRNA data base (Van de Peer *et al.*, 1994)

Tableau A.3.2 : Taux de C+G des bactéries intracellulaires obligatoires. (1) Taux de C+G du génome complet. (2) Taux de C+G en troisième position de codon des gènes *hsp60*. (3) Taux de C+G au niveau de l'ADNr 16S [moyenne±σ (nombre d'espèces)]. (e) : endocytobiote ; (eII) : endocytobiote secondaire ; les données concernant les endocytobiotes de *Sitophilus oryzae* ont été déterminées dans ce travail et seront discutées au paragraphe C.1.3.

BACTÉRIES	CG(1)	CGIII(2)	CG16S (3)
Eubactéries Gram-positives (faible taux de C+G)			
Mycoplasma	48-52	-	47,39±1,29 (n=99)
Mastotermes darwiniensis (e)	-	-	47,2 (n=1)
Alpha protéobactéries			
Anaplasma marginale	51	-	52,4 (n=1)
Bangasternus orientalis (e)	-	-	47,6 (n=1)
Bartonella	-	-	54,5±0,18 (n=7)
Bartonella bacilliformis	-	28,4	-
Caedibacter	40-44	-	-
Caedibacter caryophila	-	-	54,3 (n=1)
Cowdria	-	-	48,6±0,08 (n=4)
Cowdria ruminantum	-	15,0	-
Coxiella	43	-	-
Coxiella burnetii	-	43,9	53,8 (n=1)
Ehrlichia	-	-	50,22±1,55 (n=15)
Ehrlichia chaffensis	-	12,8	-
Ehrlichia risticii	-	37,2	-
Heliothis virescens (e)	-	-	53,7 (n=1)
Holospora obtusa (e)	-	-	51,4 (n=1)
Nasonia (e)	-	-	47,32±0,61 (n=8)
Neorickettsia	-	-	50,5 (n=1)
Pseudocaedibacter (e)	35-39	-	-
Rickettsia	29-33	-	50,8 ±0,37 (n=50)
Rickettsia tsutsugamushi	-	16,3	-
Rochalimaea	39	-	54,78±0,17 (n=5)
Rhinocyllus conicus (e)	-	-	47,8 (n=1)
Wolbachia (e)	30	-	47,48±1,56 (n=9)
Beta protéobactéries			
Dysmicoccus neobrivipes (e)	-	-	55,7 (n=1)
Euplote (e)	45	-	-
Gigaspora margarita (e)	-	-	53,8 (n=1)
Kinetoplastibacterium crithidi (e)	-	-	48,6 (n=1)
Polynucleobacter necessarius (e)	-	-	53,8 (n=1)
Pseudococcus longispinus (e)	-	-	55,8 (n=1)
Gamma protéobactéries			
Acyrthosiphon pisum (eII)	-	-	54,1 (n=1)
Amoeba proteus (e)	-	33,6	-
Arsenophonus nasoniae (e)	-	-	53,2 (n=1)
Buchnera aphidicola (e)	30	12,2	48,89±0,57 (n=13)
Candidatus camponotii (e)	30-32	-	48,2±0,96 (n=4)
Euscelidius (e)	31-41	-	54,3 (n=1)
Mollusques (e)	-	-	52,21±2,15 (n=14)
Glossina (e)	-	-	51±1,15 (n=5)
Proteobacterium (e)	-	-	49,75±3,16 (n=4)
Sarcobium lyticum (e)	-	-	53,2 (n=1)
Sitophilus (e)	50-55	-	53,84±0,49 (n=3)
Sitophilus oryzae (e)	54,3	62,5	53,8 (n=1)
Delta protéobactéries			
Desulfovibrio sp.	-	-	54,71 (n=1)
Ileal symbiont intracellularis	-	-	53,4±0,1 (n=2)
branche des Bactéroides et Cytophaga			
Blattabacterium (e)	26-28	-	47,00±0,28 (n=7)
branche des Chlamydia			
Chlamydia	41-44	-	50,22±0,71 (n=8)
Chlamydia pneumoniae	-	27,7	-
Chlamydia psittaci	-	26,2	-
Chlamydia trachomatis	-	27,5	-
Archébactéries			
Cilliés (e)	-	-	51,3±071 (n=5)
Mollusques (e)	-	-	52,50±1,5 (n=6)
endocytobiotes Non affiliés			
Flagellés (e)	27-49	-	-
Formica (e)	41	-	-

Nous avons tout d'abord comparé les moyennes des taux de C+G des bactéries libres et intracellulaires pour les trois critères étudiés. Le Tableau A.3.3 présente ces comparaisons.

Tableau A.3.3 : Comparaisons des taux de C+G des bactéries intracellulaires obligatoires et des bactéries libres. (a) intervalle de variation global ; (b) test non paramétrique de Mann-Whitney ; (c) test de Student réalisé sur les moyennes des genres (en écrasant les nombres d'espèces par genre, très hétérogènes), les variances ont été trouvées homogènes (p = 0,47).

	% de C+G intracellulaire $(\bar{x} \pm \sigma)$	% de C+G extracellulaire $(\bar{x} \pm \sigma)$	Seuil de probabilité
CG global	26-55 [a] (n=18)	25-75 [a] (n=202)	non testé
CGIII	26,8±13,86 (n=14)	62,5±26,45 (n=45)	0,002 [b]
CG16S	51,00±3,123 (n=46)	55,147±3,382 (n=447)	0,0001 [c]

Les histogrammes de distribution des CG16S ont été comparés globalement (Figure A.3.1) mais aussi au niveau des grands groupes phylogénétiques (données non présentées). Une différence marquée entre les bactéries intracellulaires et les bactéries libres a ainsi été mise en évidence aussi bien dans les groupes à faible taux de C+G (bactéries gram-positives à faible C+G) que dans les groupes à fort taux de C+G (Archébactéries).

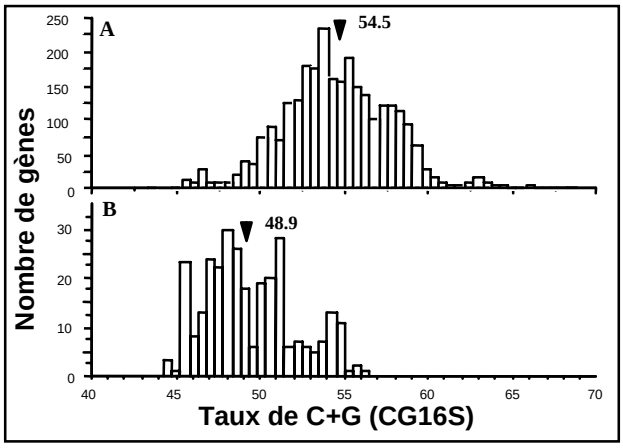


Figure A.3.1 : Comparaison des histogrammes de distribution des CG16S des bactéries intracellulaires obligatoires et des bactéries libres. Les positions des médianes sont repérées par une flèche sur la figure. A : bactéries extracellulaires (n = 2783 espèces) ; B : bactéries intracellulaires obligatoires (n = 292 espèces).

De ces résultats, il apparaît que les bactéries intracellulaires possèdent des taux de C+G globalement plus faibles que les bactéries extracellulaires. Les raisons de cette diminution ne sont pas connues, néanmoins diverses hypothèses peuvent être avancées pour expliquer ce phénomène :

(1) la perte sélective de gènes riches en C+G dans les génomes intracellulaires ;

(2) l'accessibilité limitée des précurseurs nécessaires à la biosynthèse des bases C et G dans le cytoplasme hôte ;

(3) la sélection d'une composition riche en A et T optimale en termes de stabilité de la molécule d'ADN (sélection négative) et de vitesse de transcription (sélection positive).

Il a été montré chez les procaryotes que les gènes les plus longs sont aussi les plus riches en C+G (Oliver et Marin, 1996). Il serait ainsi intéressant de vérifier si, comme le suggère l'hypothèse (1), les gènes les plus courts sont préférentiellement conservés lors de la diminution de la taille des génomes intracellulaires. L'accessibilité des précurseurs de la biosynthèse des bases C et G (hypothèse 2) n'a, à notre connaissance, pas été analysée chez les bactéries intracellulaires. Enfin, par rapport à l'hypothèse (3), nous avons cherché une éventuelle corrélation entre la taille des génomes et leur taux de C+G chez les bactéries extracellulaires d'une part, et chez les intracellulaires d'autre part (Figure A.3.2.).

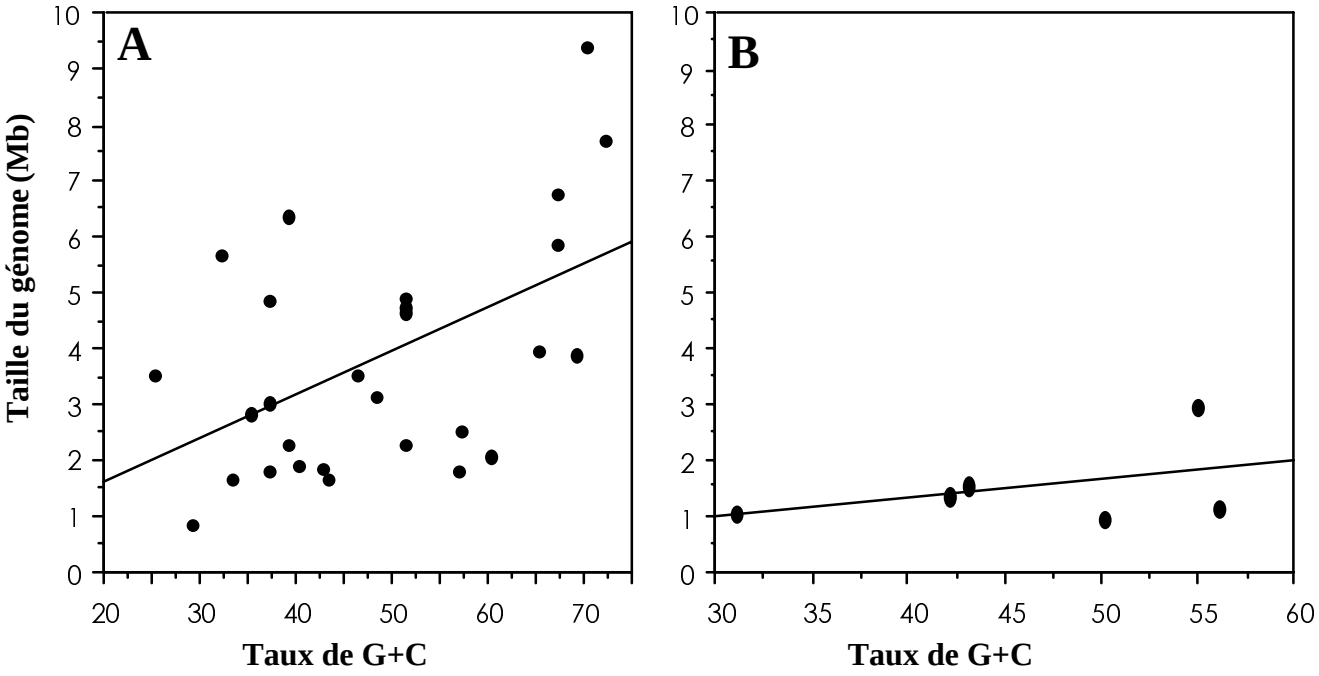


Figure A.3.2. : Corrélation entre la taille du génome (estimée par électrophorèse en champs pulsés) et (**A**) le taux de C+G des bactéries extracellulaires (n = 28) et (**B)** des bactéries intracellulaires (n = 8).

Une corrélation faible (r = 0,51) mais très significative (P = 0,005) a été trouvée entre la taille du génome et le taux de C+G des bactéries extracellulaires (chez les intracellulaires, la corrélation n'est pas significative à cause du faible nombre de données). Ces résultats peuvent s'interpréter selon l'hypothèse (3), comme une adéquation entre taille du génome et taux de C+G. L'accumulation de bases A et T chez les bactéries intracellulaires pourrait alors être considérée comme un effet indirect lié à la diminution de la taille du génome. Aucun autre élément de preuve ne permet néanmoins d'étayer cette hypothèse pour le moment.

A.3.3.3. Conclusion : le génome de *Buchnera aphidicola*

La reproduction sexuée permet le brassage génétique et ainsi l'adaptation des organismes aux variations des forces de sélection (variation du milieu extérieur). Elle prévient de plus l'accumulation de mutations délétères (Crow, 1994). A *contrario*, la persistance de lignées d'organismes à reproduction purement asexuée selon la plupart des modèles d'évolution paraît impossible (Hurst et McVean, 1996). Cependant, des populations d'endocytobiotes se maintiennent dans leurs hôtes, et ceci depuis plusieurs millions d'années. Le modèle du puceron du pois, *Acyrthosiphon pisum* associé à la bactérie *Buchnera aphidicola* depuis 200 à 250 millions d'années, offre un exemple particulièrement bien étudié de cette possibilité de persistance (Munson *et al.*, 1991 ; Baumann *et al.*, 1995).

Moran *et al*. (1995) ont montré que le taux de substitution au niveau de l'ADNr 16S (gène *rrs*) était plus élevé chez *Buchnera* que chez les autres bactéries libres. La même observation a été faite au niveau de l'ADN codant qui accumule un nombre important de mutations non silencieuses. Ce taux de substitution important est effectivement prévu par les modèles classiques d'évolution des populations à reproduction asexuée (Kondrashov, 1993). Le phénomène est encore amplifié dans les petites populations d'endocytobiotes qui sont d'une part séquestrées à l'intérieur de leurs hôtes (ce qui empêche les recombinaisons) et qui d'autre part subissent l'effet des "goulots d'étranglement" lors de leur transmission à la descendance. En effet, seule une très faible partie de la population bactérienne contamine l'ovocyte et est à l'origine de la nouvelle population de symbiotes des pucerons descendants. Cet effet de "Muller rachet" influence les sites soumis à la sélection mais ne devrait, en théorie, pas avoir d'influence sur les sites neutres. C'est donc l'effet d'un biais mutationnel favorisant l'apparition des bases A+T qui serait responsable des 30% de C+G de l'ADN de cette bactérie (Dasch *et al.*, 1984 ; Ishikawa, 1989a). Les effets de ce biais mutationnel sont d'autant plus marqués que la force de sélection est faible dans le milieu intracellulaire très stable.

On peut alors se demander comment les populations de *Buchnera* parviennent à se maintenir dans leurs hôtes. Selon Moran et Bauman (1994), des mécanismes de compensation viennent contrer les effets négatifs de cette évolution particulière. La perte de gènes, et leur transfert vers le noyau ou vers des plasmides, peut être une première forme de compensation. Le deuxième mécanisme pourrait être chez *Buchnera* une perte spécifique du gène recF impliqué dans la réparation de l'ADN (Bauman *et al.*, 1995). En effet, en limitant ses possibilités de réparation, la population bactérienne favorise l'élimination des individus accumulant trop de mutations délétères. Enfin, la surexpression d'une molécule chaperon de la famille des protéines Hsp60 permet peut-être de contrer les effets des mutations non-silencieuses dans l'ADN codant, en assistant le repliement des protéines dont les structures tertiaires et quaternaires ont été altérées.

En conclusion de ce chapitre, il apparaît que le milieu intracellulaire est propice à une évolution très particulière des populations bactériennes. L'absence de recombinaisons génétiques et les

goulots d'étranglement combinés à une pression de mutation directionnelle semble favoriser l'apparition des bases A et T dans les génomes au niveau de tous les sites qu'ils soient neutres ou pas. La stabilité des conditions environnementales et l'absence de concurrence inter-spécifique permettent une forme de régression du génome bactérien (pertes et transferts de gènes) qui limite ainsi les effets de l'accumulation des mutations délétères. Le milieu intracellulaire permet également la compensation énergétique (fourniture de nutriments), ce qui peut expliquer par exemple la surproduction de protéine chaperon chez *Buchnera*. L'hôte peut encore compenser, par la fourniture d'enzymes, les faiblesses métaboliques de ces endocytobiotes. Enfin il est possible qu'il puisse sélectionner (au niveau des bactériocytes) les sous-populations d'endocytobiotes les plus compétitives, en éliminant ses propres cellules non fonctionnelles (Moran, 1996).

A.4. INTERVENTION DES ENDOCYTOBIOTES DANS LE METABOLISME DE LEURS HOTES

La mise en place d'une relation d'endocytobiose durable passe nécessairement par l'établissement de mécanismes d'interactions et de régulations métaboliques complexes entre l'hôte et ses endocytobiotes. La régulation de la respiration aérobie (par les mitochondries) ou de la photosynthèse (par les chloroplastes) chez les eucaryotes offre un magnifique exemple d'une intégration réussie, il y a environ un milliard d'années.

En ce qui concerne les modèles d'endocytobiose plus récents, la comparaison d'individus aposymbiotiques (lorsqu'ils sont viables) et symbiotiques, a permis de mettre en évidence sur de nombreux modèles les apports métaboliques des endocytobiotes. Le but de ce chapitre n'est pas de dresser une liste exhaustive des modèles d'endocytobioses étudiés à ce jour, mais plutôt de montrer la diversité des mécanismes impliqués. L'intervention des endocytobiotes dans le métabolisme de l'hôte est un thème central du laboratoire de biologie de l'INSA, notamment en ce qui concerne les modèles puceron et charançon qui seront plus particulièrement décrits.

A.4.1. Utilisation d'éléments inorganiques (Sulfate, CO_2 et azote atmosphérique)

Les mollusques bivalves des sources hydrothermales profondes ont recours à la chimiosynthèse effectuée par des bactéries symbiotiques intracellulaires localisées dans les branchies de l'animal. Chez *Caliptogena phaseliformis* (Fiala-Medioni, 1988), il a été montré que les endocytobiotes sont capables de fixer le CO_2 et d'oxyder les sulfates de l'eau ; les métabolites formés sont ensuite fournis à l'hôte.

Les endocytobiotes de la blatte (*Blattella germanica*) utilisent le sulfate inorganique pour l'incorporer dans des acides aminés soufrés tel que la méthionine et la cystéine. Ceux-ci seront ensuite fournis à l'hôte (Block et Henry, 1961).

Enfin, la fixation de l'azote atmosphérique par les endocytobiotes des nodosités des légumineuses (Masterson *et al.*, 1982) est un exemple de l'importance économique de certaines symbioses. Ces bactéries (*Rhizobium*, *Bradyrhizobium*) permettent aux légumineuses de se développer sur des sols relativement pauvres en azote en transformant l'azote atmosphérique en nitrate. "En échange" des nitrates fournis, la plante apporte aux bactéries leur protection et les substrats carbonés issus de la photosynthèse. Les gènes responsables de la formation des nodules (nod) et de la fixation de l'azote (nif et fix) ont été caractérisés chez *Rhizobium japonicum*. Il semble que la plante puisse contrôler l'expression des gènes de fixation (localisés sur les plasmides) en modulant la disponibilité de certains substrats, et notamment la concentration en oxygène (Megias *et al.*, 1993).

A.4.2. Fourniture de vitamines et de facteurs de croissance

La fourniture, par les endocytobiotes, d'au moins deux facteurs de croissance indispensables (acide folique et bioptérine) a été montrée chez la paramécie, *Paramecium octaurelia* (Soldo *et al.*, 1982). Chez les insectes, la fourniture de vitamines hydrosolubles comme la vitamine C, le pantothénate, la riboflavine, la biotine ou la pyridoxine, semble être un phénomène assez courant. Cet apport en vitamines a été mis en évidence chez *Pediculus capitata* (Koch, 1967), *Glossina morsitans* (Nogge, 1976), *Stegobium paniceum* (Pant et Dang, 1972), *Blattella germanica* (Noland *et al.*, 1949) et *Neomyzus circumflexus* (Ehrhardt, 1962). Chez les pucerons, la fourniture symbiotique de riboflavine a été suggérée (Ehrhardt, 1968). Chez le charançon *Sitophilus oryzae*, les endocytobiotes synthétisent de la riboflavine, de l'acide pantothénique, de la biotine et en plus faible quantité de l'acide folique, de la pyridoxine et de l'acide nicotinique (Wicker, 1983). Enfin, Heddi (1990) a montré, chez *Sitophilus oryzae*, que les activités spécifiques d'au moins six enzymes mitochondriales de la chaîne respiratoire sont plus importantes chez les individus symbiotiques que chez les aposymbiotiques. Comme l'expression des gènes mitochondriaux des deux souches semble équivalente (Heddi, communication personnelle), l'hypothèse de la fourniture symbiotique de cofacteurs enzymatiques semble la plus probable pour expliquer les différences observées. Il est à noter que la souche aposymbiotique de *Sitophilus oryzae* montre une inaptitude au vol très marquée (Grenier *et al.*, 1994). Ces résultats sont à corréler à la déficience mitochondriale précédemment décrite.

A.4.3. Intervention des endocytobiotes dans le métabolisme des lipides

La participation des endocytobiotes dans le métabolisme des stérols et des acides gras a été montrée grâce à des précurseurs marqués au ^{14}C chez le bivalve *Solemya velum* qui colonise les sédiments riches en soufre des mers profondes (Conway et Capuzzo, 1991). Chez les insectes, la participation des endocytobiotes dans le métabolisme des lipides a été observée sur quelques modèles mais n'apparaît pas comme un élément crucial des relations hôte/symbiotes. Chez le puceron du pois *Acyrthosiphon pisum*, les endocytobiotes incorporent le ^{14}C de l'acétate dans toutes les classes de lipides (Houk *et al.*, 1976). Chez *Sitophilus granarius*, les endocytobiotes pourraient participer à la désaturation de certains lipides (Yadava *et al.*, 1972). Enfin, chez *Sitophilus oryzae*, Wicker (1984) a montré que contrairement aux individus symbiotiques, les individus aposymbiotiques ne se développent pas sur un milieu délipidé à l'acétone. La nature des lipides fournis par les bactéries n'a pas été déterminée pour le moment.

A.4.4. Intervention des endocytobiotes dans le métabolisme des acides aminés

La fourniture d'acides aminés par les endocytobiotes a été démontrée expérimentalement soit par l'utilisation de milieux nutritifs carencés, soit par l'incorporation de traceurs radioactifs. Ainsi, les endocytobiotes de la blatte *Blattella germanica* (Henry et Block, 1961) synthétisent et fournissent à l'hôte au moins huit acides aminés (tyrosine, phénylalanine, isoleucine, arginine, thréonine, valine, méthionine et cystéine). Il semble que la synthèse de ces acides aminés soit effectuée à partir de l'acide urique accumulé avant l'excrétion dans des cellules particulières (urocytes) en connection avec les bactériomes du tissu adipeux (Valovage et Brooks, 1979).

Chez le puceron *Myzus persicae*, Mittler (1971) a montré que les individus symbiotiques peuvent se contenter de seulement trois acides aminés essentiels (isoleucine, méthionine et histidine). Par contre, les individus aposymbiotiques en demandent au moins sept de plus (thréonine, valine, leucine, phénylalanine, tryptophane, lysine et arginine).

La synthèse d'acides aminés essentiels (thréonine, isoleucine et lysine) a été mise en évidence dans la souche symbiotique du puceron du pois *Acyrthosiphon pisum*. Le suivi de traceurs marqués au ^{14}C, à montré que ces acides aminés sont synthétisés par les endocytobiotes à partir des carbones du pool global d'acides aminés libres de cet insecte (Febvay *et al*., 1995 ; Liadouze *et al*., 1996).

Chez le charançon *Sitophilus oryzae*, le développement de la souche aposymbiotique est grandement amélioré par la supplémentation d'un régime standard en tyrosine et en phénylalanine, alors qu'un tel apport n'a aucun effet sur les souches symbiotiques (Wicker et

Nardon, 1982). Nous pouvons également noter que les individus aposymbiotiques présentent une cuticule plus claire et plus molle que celle des individus symbiotiques. Cette observation est à rapprocher du fait que la tyrosine est impliquée dans les phénomènes de mélanisation responsables de la couleur de la cuticule (Nardon et Grenier, 1988).

Enfin, Gasnier-Fauchet et Nardon (1987) ont montré chez *Sitophilus oryzae* que les endocytobiotes participent au métabolisme des acides aminés soufrés. En effet, le blé est un aliment très riche en méthionine et les charançons doivent faire face au problème de l'élimination de la méthionine en excès. Chez les individus symbiotiques, la méthionine est oxydée en méthionine sulfoxide par les endocytobiotes avant d'être excrétée. Chez les individus aposymbiotiques, la méthionine est transformée en sarcosine via la S-adénosyl méthionine (SAM), voie consommatrice d'ATP. Il est important de noter que chez les mammifères la transformation de la sarcosine en glycine se fait grâce à la sarcosine déshydrogénase, une enzyme mitochondriale qui semble déficiente chez le charançon. La transformation, par les endocytobiotes, de la méthionine en sa forme sulfoxidée apparaît donc comme une complémentation symbiotique d’une déficience mitochondriale de l’hôte.

A.4.5. Conclusion : participation des endocytobiotes à l'adaptation de l'hôte aux variations du milieu

Buchner, en 1965, note une étroite corrélation entre l'acquisition des symbiotes chez les insectes et leur régime alimentaire. Ainsi, remarque-t-il la présence quasi-systématique des symbiotes chez les insectes se nourrissant sur des milieux pauvres ou très déséquilibrés comme le sang ou le phloème. La fonction principale des symbiotes, selon l'auteur, serait donc de fournir à l'hôte les facteurs de croissance absents de son alimentation.

Le nombre important de travaux réalisés sur les endocytobioses (principalement chez les insectes) montrent maintenant que le rôle des endocytobiotes est beaucoup plus complexe. En effet, la symbiose ne peut plus être considérée selon un schéma purement additif, la notion d’interaction hôte / symbiote doit être prise en compte pour décrire le symbiocosme (Nardon, 1995). Certes, la fourniture de composés nutritionnels essentiels reste primordiale, mais d'une façon plus générale on peut considérer que l'endocytobiote permet le maintien d'une certaine homéostasie et donc d'une certaine adaptabilité de l'insecte aux variations de son substrat alimentaire (Bonnot, 1996).

Ainsi, l'apparition de l'agriculture, il y a maintenant quelques milliers d'années, en augmentant la taille, le nombre et les stocks de graines de céréales, a fourni aux insectes sitiophiles un substrat potentiel quantitativement important mais qualitativement médiocre (le blé par exemple est très déséquilibré en acides aminés). C'est certainement la symbiose qui, chez les espèces

granivores du genre *Sitophilus,* a permis le changement d'alimentation et la colonisation des stocks de blés (Delobel et Grenier, 1992).

Chez les insectes phloèmophages, ce potentiel d'adaptation est encore plus marqué. L'aleurode *Bemisia argentifolii*, pour faire face au stress osmotique engendré par l'excès de sucre présent dans le phloème des plantes, utilise ses endocytobiotes. Ceux-ci synthétisent une quantité importante de tréhalulose, un sucre qui n'est pas métabolisé par l'hôte et qui est directement excrété dans le miellat (Davidson *et al.*, 1994).

Enfin, chez le puceron du pois *Acyrthosiphon pisum*, Liadouze (1995) a suivi le devenir de 17 acides aminés marqués chez des insectes aposymbiotiques et symbiotiques élevés sur différents milieux artificiels. Par rapport à la problématique de ce paragraphe, deux résultats principaux peuvent être dégagés de cette étude :

(1) - sur milieu déséquilibré les individus symbiotiques sont capables de palier la majorité des déficiences grâce à leurs endocytobiotes (sauf celle de l'histidine) ;

(2) - sur milieu équilibré, où aucune transformation métabolique n'est nécessaire pour obtenir un équilibre de nutriments conforme à la demande anabolique, un important remaniement du profil d'acides aminés est néanmoins observé chez les individus symbiotiques.

Le remaniement d'acides aminés, observé uniquement chez les individus symbiotiques, comporte la destruction sous forme de CO_2 d'une importante quantité d'acides aminés ingérés et la synthèse de ces mêmes acides aminés à partir entre autre du saccharose. Ce gaspillage énergétique apparent est en fait le "prix à payer" par le puceron pour sa survie sur sa plante hôte. En effet, le phloème est non seulement un substrat très déséquilibré (taux de sucre très important, faible teneur en protéine), mais sa composition est en plus extrêmement variable en fonction de la localisation sur la plante ou de l'ensoleillement par exemple.

Pour conclure, nous noterons que les seuls organismes qui aient réussi à coloniser toutes les niches écologiques sont les bactéries. En effet, même les déserts les plus arides ou les sources hydrothermales les plus chaudes sont contaminés par des microorganismes. Il n'est donc pas surprenant que l'adaptation à des substrats à la fois pauvres et variables d'un certain nombre d'animaux supérieurs, et notamment d'insectes ravageurs, soient liée à la présence de bactéries symbiotiques.

A.5. UNE PROTEINE DE STRESS IMPLIQUEE DANS L'ENDOCYTOBIOSE : LA PROTEINE Hsp60.

La notion de symbiose est chargée, d'un point de vue culturel, de connotations positives (bénéfices mutuels, associations pacifistes, entraides. Mais la découverte de protéines de stress chez les symbiotes a dévoilé un fait important : l'endocytobiose est aussi génératrice de stress pour les deux partenaires (Tiivel, 1993 ; Jéon, 1995). En effet, la survie d'un organisme procaryote à l'intérieur du cytoplasme d'un eucaryote nécessite, de la part de l'endocytobiote le contournement des mécanismes hôtes de la reconnaissance du non soi, et de la part de l'hôte un contrôle rigoureux de la multiplication des endocytobiotes pour éviter une invasion fatale (Nardon et Wicker, 1981 ; Ishikawa, 1989b).

La production de protéines de stress de la famille des Hsp60 a été observée chez de nombreuses bactéries parasites : *Salmonella typhi* (Lindler et Hayes, 1994) ; *Chlamydia trachomatis* (Ho et Zhang, 1994) ; *Mycobacterium paratuberculosis* (Colston *et al.*, 1994) ; *Pasteurella multicoda* (Love *et al.*, 1995). Il est possible que ces protéines permettent la survie des parasites dans l'environnement intracellulaire hostile des cellules hôtes, soit en maintenant la structure des protéines bactériennes essentielles, soit en participant à la production et à l'excrétion des facteurs de virulence (Mollenhauer et Schulmeister, 1992 ; Kaufmann, 1992 ; Jacquier-Sarlin et Polla, 1994).

Chez le puceron *Schizaphis graminum*, Bauman *et al.* (1996) ont suivi le taux de protéines Hsp60 des endocytobiotes au cours du développement de l'insecte. Un taux relativement constant de 1,6 10^5 molécules de Hsp60 par μm^3 a été trouvé. Cette concentration (environ 10 % des protéines totales) correspond au taux de protéines Hsp60 trouvé chez *Escherichia coli* cultivée en condition de stress thermique à 46°C. Une telle production de protéines de stress a également été observée chez l'amibe, *Amoeba proteus* (Ahn *et al.*, 1991) et chez les endocytobiotes de la mouche tsé-tsé, *glossina sp.* (Aksoy, 1995).

Il est remarquable que même dans les relations d'endocytobiose, où la virulence des bactéries est atténuée, la surexpression de protéines Hsp60 soit observée de façon systématique. La conservation de cette induction au cours de la coévolution des deux partenaires semble indiquer un rôle prépondérant de cette molécule dans le maintien de l'équilibre des relations hôte/symbiotes.

Avant de décrire plus précisément les implications des protéines Hsp60 dans les relations hôte-parasites et hôte-endocytobiotes, les principales propriétés biochimiques de ces protéines et la régulation de l'expression de leurs gènes chez les bactéries libres seront présentées.

A.5.1. Principales propriétés biochimiques des protéines Hsp60

C'est le généticien italien Ritossa, en 1962, qui découvrit fortuitement le phénomène des puffs chromosomiques sur les chromosomes polytènes de la drosophile soumis à un choc thermique (cité dans Morange, 1993). Il fallut encore attendre dix ans pour que Tissières *et al.* (1974) identifient les prmduits de ces gènes : les protéines de choc thermique (Heat shock protein). Un nombre très important de Hsp a été identifié depuis et celles-ci ont été classées en familles correspondant à leur poids moléculaire (Ellis, 1987 ; Ellis et Van der Vies, 1991 ; Hendrick et Hartl, 1993).

Dans la famille des Hsp60, la protéine la plus étudiée est la protéine d'*Escherichia coli* appelée GroEL (Hendrix, 1979 ; Zeilstra-Ryalls *et al.*, 1991). D'autres protéines Hsp60 ont été caractérisées dans les chloroplastes (Hemmingsen *et al.*, 1988 ; Ellis, 1990 ; Gatenby et Viitanen, 1994) et dans les mitochondries (Gupta *et al.*, 1989 ; Singh *et al.*, 1990). Plus récemment, une protéine appelée TF55, possédant des homologies structurales et génétiques avec la famille des Hsp60, a été identifiée chez les Archébactéries (Trent, 1996), et une autre appelée Tcp1 dans le cytoplasme des cellules eucaryotes (Trent *et al.*, 1991). La localisation de ces protéines est généralement cytoplasmique, néanmoins quelques auteurs ont montré une localisation membranaire par exemple chez *Helicobacter pylori* et *Neisseria gonorrhoeae* (Yamaguchi *et al.*, 1994 ; Pannekoek *et al.*, 1995).

A.5.1.1. Structure biochimique du complexe GroE

GroEL est un complexe protéique composé de deux fois sept sous-unités identiques de 57 kDa arrangées en deux tores superposés. Cette structure caractéristique, de 14 nm de diamètre extérieur et 15 nm de hauteur, délimite un canal central de 4,5 nm de longueur. Elle a été observée en microscopie électronique à transmission (Harris *et al.*, 1994, 1995), en cristallographie (Braig *et al.*, 1994) et en microscopie à force atomique (Mou *et al.*, 1996). Le poids moléculaire du complexe est d'environ 840 kDa (Chandrasekhar *et al.*, 1986).

Chaque monomère est composé d'un domaine apical, d'un domaine intermédiaire et d'un domaine équatorial (Braig *et al.*, 1994). Le domaine équatorial est le plus grand des trois, il est responsable des liaisons entre les différentes sous-unités du complexe. Il contient également le site de fixation et d'hydrolyse de l'ATP. Le domaine intermédiaire est le plus petit, il sert probablement de charnière mobile lors des cycles d'association et de dissociation du substrat. Enfin, le domaine apical forme la paroi de la cavité centrale, véritable "banc de travail" de la protéine (Hendrick et Hartl, 1995).

La protéine GroEL a la particularité de se lier à une autre molécule chaperon de la famille des Hsp10 appelée GroES chez *Escherichia coli* (Tilly et Georgopoulos, 1982). La forme native de

GroES est un heptamère (Hunt *et al.*, 1996) qui peut venir se fixer sur le tétradécamère GroEL pour former le complexe GroE. La liaison s'effectue au niveau d'un site particulier de GroES, une boucle de 17 acides aminés sans structure secondaire fixe et ayant une grande flexibilité (Landry *et al.*, 1993). La fixation et le relargage de cette protéine interviennent dans les mécanismes de régulation de l'activité de GroEL.

A.5.1.2. Rôle physiologique du complexe GroE

En 1987, Ellis propose le terme de protéine chaperon pour désigner une molécule qui empêche les interactions incorrectes et assiste le repliement d'une protéine ou l'assemblage d'un complexe oligomérique sans faire partie de l'édifice final. Le terme avait été utilisé pour la première fois par Laskey (1978) à propos de l'action de la nucléoplasmine dans la formation du nucléosome. Les protéines Hsp60 et Hsp70 sont les deux principales familles de chaperons moléculaires de la cellule bactérienne. Néanmoins de très nombreuses autres protéines chaperons ont été décrites, toutes ne sont d'ailleurs pas inductibles par choc thermique (Morange et Bensaude, 1990 ; Ellis et Van der Vies, 1991 ; Morange, 1993 ; Gatenby et Viitanen, 1994 ; Buchner, 1996).

Le complexe GroE est essentiel pour la croissance d'*Escherichia coli* à toutes les températures (Fayet *et al.*, 1989), mais historiquement sa première fonction étudiée a été celle de l'assemblage de la tête des phages λ et T4. Les mutants GroE$^-$ sont facilement isolables puisqu'ils restent viables après infection par un de ces phages (Georgopoulos *et al.*, 1973). L'observation de leur phénotype a alors permis aux chercheurs d'étudier le champ d'action du complexe GroE sur la physiologie générale d'*Escherichia coli*.

Ainsi, il a été observé chez ces mutants une réduction du taux d'ADN et d'ARN, un blocage de la division cellulaire et une altération de l'activité protéasique (Zeilstra-Ryalls *et al.*, 1991). L'interaction de GroEL avec la synthèse d'ADN et la division cellulaire semble liée à la protéine DnaA responsable de l'initiation de la réplication du chromosome (Chattoraj, 1995). En effet, la surexpression des protéines GroEL et GroES, dans une souche mutée sur le gène DnaA (dnaA46) restaure le phénotype sauvage alors que la même surproduction de GroEL et GroES n'entraîne aucun effet sur la réplication de la souche sauvage (Fayet *et al.*, 1986). Le rôle des chaperons dans la dégradation des protéines a été sugéré par de nombreux travaux (cités dans Hayes et Dice, 1996) ; ainsi le complexe GroE pourrait, par exemple, stimuler l'activité de la protéase Clp.

Enfin, la purification de la protéine GroEL (Hendrix, 1979) et l'étude de ses propriétés *in vitro* ont permis de définir son activité principale : l'aide au repliement de nombreuses protéines dénaturées ou nouvellement synthétisées (Bochkareva *et al.*, 1988 ; Goloubinoff *et al.*, 1989 ; Kawata *et al.*, 1994 ; Mizobata et Kawata, 1996 ; Rospert *et al.*, 1996). Cette renaturation requiert tout d'abord la reconnaissance du substrat dénaturé (Landry et Gierasch, 1991), puis la

fixation et l'hydrolyse d'ATP (Todd *et al.*, 1994), ainsi que la présence de cofacteurs cationiques (Mg^{2+}, Ca^{2+}) (Azem *et al.*, 1994). C'est ainsi qu'en 1991, Ellis définit en ces termes le rôle physiologique du complexe GroE : "Les protéines Hsp60 se lient à de nombreux polypeptides non repliés au cours de processus comme la synthèse, le transport protéique ou la dénaturation thermique. Cette liaison maintient le polypeptide en un état qui l'empêche de mal se replier, l'assiste jusqu'à son repliement inter et intra-moléculaire final, lui permet un transport plus rapide vers son lieu d'excrétion ou de translocation, et peut éventuellement permettre aux protéases de le dégrader".

A.5.1.3. Un modèle d'action pour le complexe GroE

Zeilstra-Ryalls *et al.* (1991) ont proposé un modèle d'action pour le complexe GroE basé sur quatre hypothèses : (1) GroEL se lie à de nombreux polypeptides dénaturés ou non repliés ; (2) GroES seul ne se lie pas à de telles molécules ; (3) GroEL et GroES interagissent en présence d'ATP dont l'hydrolyse provoque le relargage du substrat (ou d'une partie du substrat) ; (4) GroES fonctionne comme un engrenage sur GroEL et favorise le déplacement et le relargage de la protéine native. L'originalité de ce modèle vient de la quatrième hypothèse basée sur le fait que des séquences répétées découvertes à la fois sur GroES et GroEL pourraient servir de plan de roulement entre les deux molécules par ruptures et établissements successifs de points de contacts semi-équivalents. Mais la découverte d'un site unique et différent du site de liaison avec le polypeptide de fixation de GroES sur GroEL (Landry *et al.*, 1993) réfute en partie cette hypothèse.

Hendrick et Hartl (1993) proposent un modèle plus élaboré reprenant les trois premières hypothèses de Zeilstra-Ryalls *et al.* (1991), compatible avec l'existence d'un site spécifique de fixation GroE et intégrant de plus quatre hypothèses d'ordre fonctionnel et structural : (1) le repliement se fait à l'intérieur de la cavité centrale de GroEL ;(2) un simple anneau de sept sous-unités est capable de replier une protéine ;(3) GroES, sous forme d'heptamère, se fixe à une extrémité d'un des anneaux de GroEL ce qui modifie sa conformation et régule l'activité ATPasique du complexe ;(4) plusieurs molécules d'ATP peuvent être utilisées au cours du cycle de repliement. Martinus *et al.* (1995) complexifieront encore le modèle en ajoutant les notions d'alternance d'affinité pour le substrat entre les deux anneaux GroEL, en fonction de la fixation ou de la dissociation de GroES. Enfin, Hendrick et Hartl (1995) proposent un modèle encore plus synthétique, intégrant non seulement la stoechiométrie des molécules d'ATP fixées et hydrolysées mais également la possibilité d'un relargage du substrat sous forme partiellement renaturée à chaque étape du cycle (Weissman, 1994). Ce modèle est présenté Figure A.5.1.

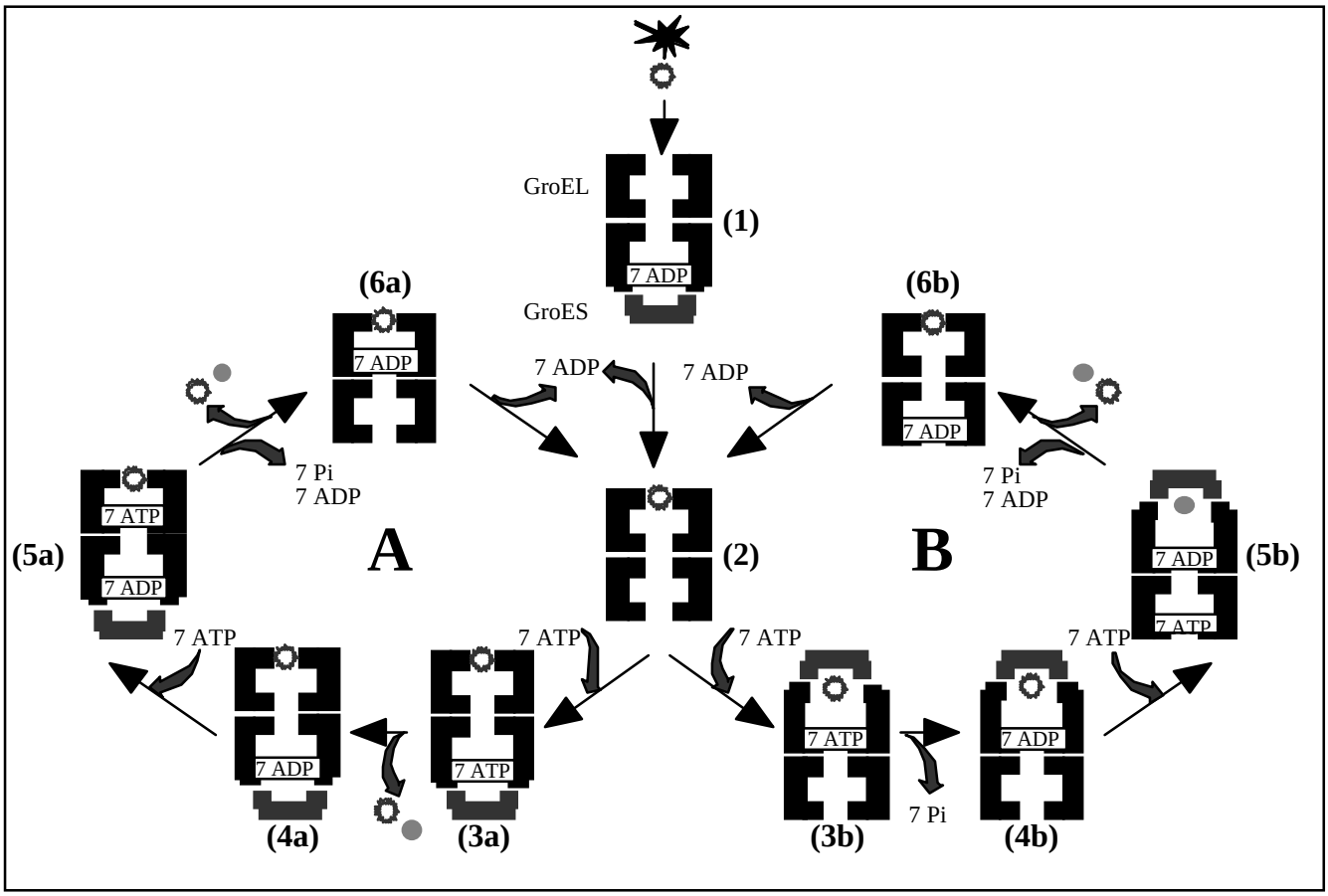


Figure A.5.1 (d'après Hendrick et Hartl, 1995) : Modèle d'interactions ATP-dépendantes entre GroEL, GroES et le polypeptide substrat.
✸ : protéine dénaturée ; ✿ : protéine partiellement renaturée ; ● : protéine native.
(1) : le complexe GroE est asymétrique, un seul anneau est lié à GroES et à l'ADP, la fixation du substrat induit la dissociation de GroES et de l'ATP (2) et initie le processus de repliement selon deux schémas possibles (A et B). En A, la fixation de GroES et de l'ATP (3a) se fait sur l'anneau opposé à l'anneau ayant fixé le substrat. L'hydrolyse de l'ATP permet le relargage de la protéine native ou d'un intermédiaire partiellement renaturé (4a). La fixation de sept autres molécules d'ATP sur le deuxième anneau (5a) déclenche un second cycle d'hydrolyse et de relargage du substrat (6a). Enfin, la dissociation de l'ADP permet le retour à l'état (2). Le cycle B est similaire, mais la fixation de GroES a lieu sur l'anneau ayant fixé le substrat, le relargage de la protéine native ne peut donc se faire qu'au deuxième cycle d'hydrolyse d'ATP.

Parmi les aspects encore mal définis de la régulation du complexe GroE figure la fixation éventuelle de deux heptamères GroES sur chacun des anneaux GroEL, de façon à former une structure symétrique. En effet, la fixation de GroES sur un anneau GroEL inhibe fortement la fixation d'un autre GroES sur l'anneau opposé. Mais à forte concentration en Mg^{2+} (15 à 20 mM) ou à pH élevé (7,7 à 8,0), il est possible de former des complexes symétriques $GroES_7$:$GroEL_{14}$:$GroES_7$ (Chen *et al.*, 1994). De telles structures ont été observées en microscopie électronique (Harris *et al.*, 1994) mais leur rôle dans la régulation du complexe chaperon est encore discuté.

A.5.1.4. L'équipe chaperon de la cellule bactérienne : rôle dans la biosynthèse des protéines

Le repliement d'une protéine requiert un temps de quelques millisecondes, tandis que sa formation sur le ribosome demande un temps de l'ordre de la seconde (Sali *et al.*, 1994). Le repliement devrait donc théoriquement commencer avant la fin de la biosynthèse. De plus, la protéine nouvellement synthétisée, et non repliée, ne peut pas rester sous forme linéaire ; elle adopte une conformation particulière dite "fondue" (Durand, 1991). Dans cette conformation, les résidus hydrophobes sont tournés vers l'extérieur de la molécule et cette dernière devient très sensible à l'agrégation. Un pool de protéines chaperons spécifiques (Gething, 1991 ; Hartlt *et al.*, 1994 ; Polissi *et al.*, 1995) va participer à ces différentes étapes de la biosynthèse des protéines, d'une part en séquestrant les régions hydrophobes des chaînes nouvelles pour les prévenir de l'agrégation (rôle des Hsp70), et d'autre part en isolant les intermédiaires partiellement renaturés pour limiter les mauvaises interactions (rôle des protéines Hsp60). La séquestration individuelle des polypeptides néoformés à l'intérieur des protéines Hsp60 a été considérée comme une dilution infinie de la protéine pour la prévenir de l'agrégation (Anfinsen, 1973). Cette séquestration, en "cage d'Anfinsen", permet d'expliquer comment les protéines peuvent acquérir leurs structures tertiaires et quaternaires sans erreur, même aux très fortes concentrations protéiques de la cellule. Chez *Escherichia coli*, les principales protéines impliquées dans ces mécanismes sont les protéines DnaK (Hsp70), DnaJ, GrpE et GroE (Hendrick et Hartl, 1995). La Figure A.5.2 schématise le rôle de l'équipe chaperon dans la biosynthèse et le repliement des protéines. Il est à noter que des protéines homologues ont également été décrites chez les Archébactéries (Conway de Macario *et al.*, 1994).

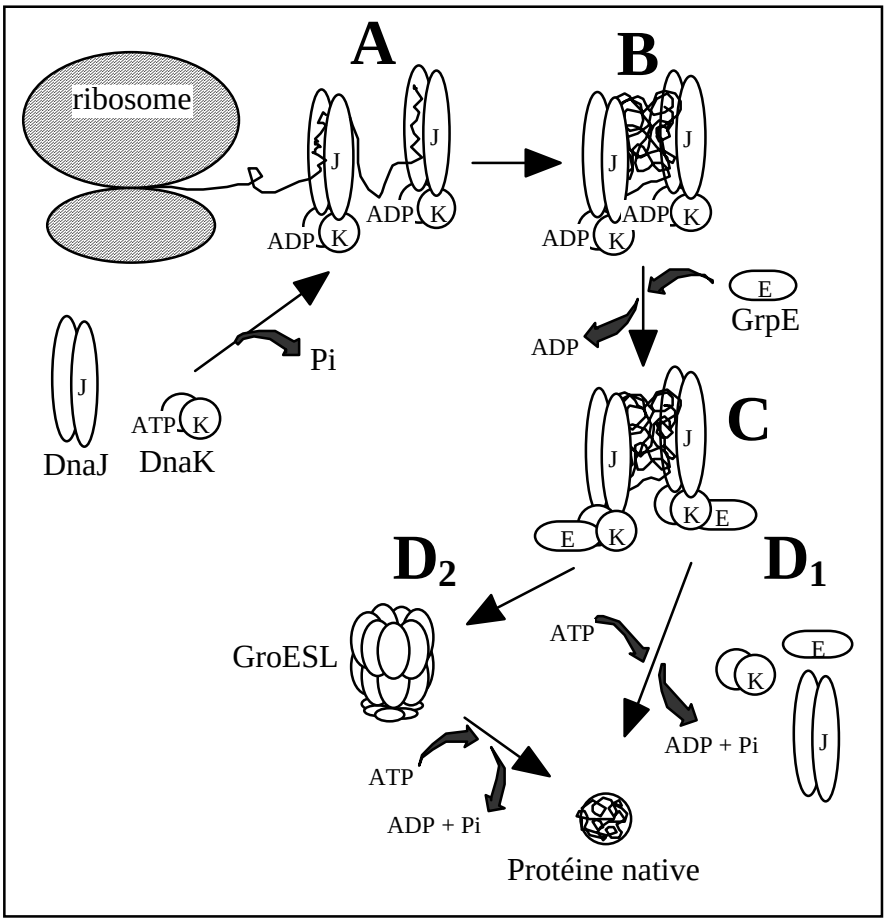


Figure A.5.2 (d'après Hendrick et Hartl, 1995) : Participation de l'équipe chaperon à la biosynthèse d'une protéine.
(A) : La protéine DnaK, associée à la protéine DnaJ, se lie à la chaîne naissante et la préserve des mauvais repliements et de l'agrégation jusqu'à la fin de sa formation (B). (C) : La fixation de la protéine GrpE libère l'ADP lié au DnaK et permet la dissociation du complexe DnaK-DnaJ-GrpE, le polypeptide est alors soit relargué sous sa forme native (D1), soit transféré au complexe GroE pour achever son repliement (D2).

A.5.2. Régulation de l'expression des gènes *hsp60*

Les gènes codant les protéines chaperons Hsp10 et Hsp60 sont regroupés en un opéron (*groE*) unique chez la plupart des bactéries. Néanmoins, chez *Bradyrhizobium japonicum* une famille multigénique, d'au moins cinq opérons *groE*, a été trouvée sur des mégaplasmides (Fischer *et al.*, 1993). Chez *Mycobacterium*, *Synecocystis* et *Streptomyces*, il existe en plus de l'opéron *groE*, un autre gène *hsp60* surnuméraire et non précédé du gène *hsp10* (Van der Vies et Georgopoulos, 1996). Enfin, les gènes *hsp60* et *hsp10* mitochondriaux sont codés par le noyau, ils ne sont pas structurés en opéron et possèdent chez *Zea mais* de nombreux introns (Pose, 1993).

L'opéron *groE* est localisé à 94 minutes sur le chromosome *d'Escherichia coli* (Georgopoulos *et al.*, 1973), son expression est régulée par l'intermédiaire de deux promoteurs : Pσ70 et Pσ32 (Figure A.5.3).

De nombreuses formes de stress peuvent induire la réponse au choc thermique : une élévation ou une baisse de température, des rayons UV ou divers agents chimiques (Lindquist, 1986 ; Neidhardt et VanBogelen, 1987 ; Welch, 1993). Une augmentation de température de 37 à 46°C provoque la multiplication par dix du taux de protéines GroEL chez *Escherichia coli* (Langer et Neupert, 1991). L'essentiel de la régulation de l'opéron *groE* est effectué à un niveau transcriptionnel. Les deux promoteurs Pσ70 et Pσ32 peuvent se fixer spécifiquement à l'ARN polymérase associée à sa sous-unité σ32 ou σ70. A température normale, la concentration cellulaire en facteur de transcription σ32 est très faible (10 à 30 molécules par cellule), car cette protéine est très instable (demi-vie de une minute) et son expression est réprimée au niveau traductionnel (Bukau, 1993). La majorité de la transcription de l'opéron *groE* est alors assurée par l'ARN polymérase (Eσ70) qui vient se fixer sur le promoteur aval Pσ70. Pendant le choc thermique, la stabilité et la synthèse de σ32 augmentent considérablement. L'expression de l'opéron est alors assurée par l'ARN polymérase Eσ32 qui vient se fixer sur le promoteur amont Pσ32 (Blaszczak *et al.*, 1995). Ce système de régulation à double promoteur est classique pour toutes les protéines à la fois synthétisées constitutivement et inductibles par choc thermique (Lathigra *et al.*, 1991).

La sous-unité σ32 de l'ARN polymérase est codée par le gène *rpoH* (Figure A.5.3). C'est la régulation post-transcriptionnelle et post-traductionnelle de ce gène qui est à l'origine de la réponse au choc thermique chez les bactéries (Van de Piers *et al.*, 1996).

En cas de choc thermique, le taux de facteur σ32 augmente très fortement car la transcription augmente et l'ARN_m est stabilisé (Tilly *et al.*, 1989). Une élévation de la température de 30 à 42°C induit la multiplication par 17 du taux de facteur σ32 chez *Escherichia coli* par exemple (Van der Vies et Georgopoulos, 1996). Cette stabilisation fait intervenir des éléments cis-régulateurs : la partie A de l'ARN_m (codon 6 à 20) interagit avec l'ARN ribosomal 16S et favorise sa traduction. La partie B (codon 153 à 247) est un élément de régulation négatif à basse température, sa délétion entraîne une augmentation importante de l'expression. A et B semblent interagir sur la structure secondaire de l'ARN_m en séquestrant le codon Start à basse température (Yura *et al.*, 1993) ; enfin, la région C (codon 364 à 433) est un site de fixation de la protéine Hsp70. La fixation de ce chaperon sur l'ARN_m bloque la traduction sur le ribosome et facilite la dégradation du nouveau polypeptide par les protéases (Mccarty *et al.*, 1996).

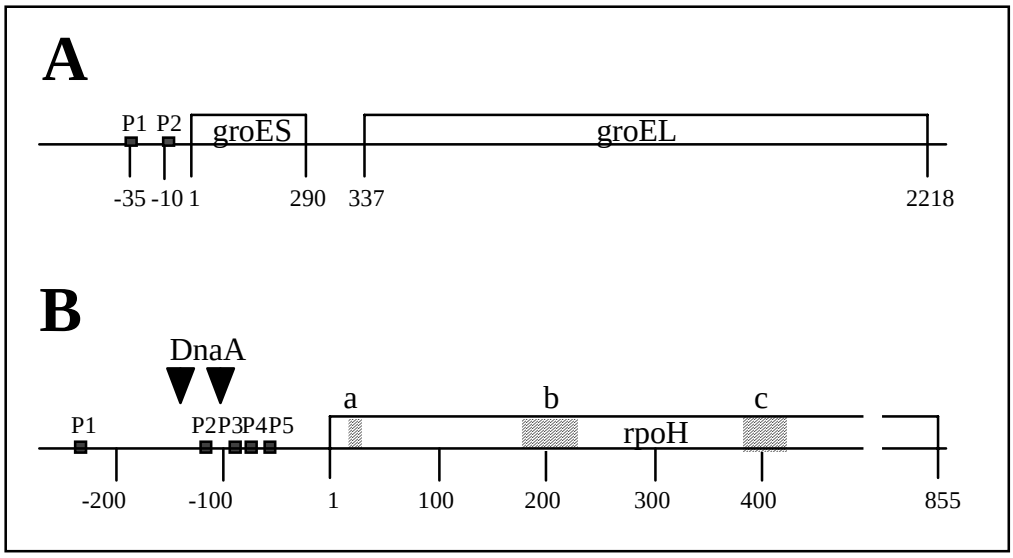


Figure A.5.3 (d'après Van de Piers *et al.*, 1996) : Structure et organisation de l'opéron *groE* et du gène *rpoH*.
(A) : L'opéron *groE* est sous la dépendance de deux promoteurs : P1, promoteur de choc thermique s'associant à la sous-unité σ32 de la polymérase et P2, promoteur constitutif s'associant à la sous-unité σ70.
(B) : Le gène *rpoH* est sous la dépendance de cinq promoteurs. P1 est le promoteur constitutif spécifique de la sous-unité σ70. P2, P4 et P5 sont aussi des promoteurs σ70, mais P2 est spécifique de la souche et P4 et P5 sont des régulateurs secondaires mineurs. Enfin, P3 est un promoteur spécifique de la sous-unité σ24. Il n'entre en jeu qu'aux conditions extrêmes de température (supérieures à 50°C). La protéine DnaA possède deux sites de fixation (repérés par des flèches) et agit en répresseur de la transcription. Les régions cis-régulatrices (a, b et c) de l'ARNm sont indiquées par des rectangles hachurés.

Il apparaît donc que la protéine DnaK est l'acteur principal de la régulation de la réponse au choc thermique dans la cellule bactérienne. En effet, à température normale, cette protéine associée aux protéines DnaJ et GrpE, est fixée sur le facteur σ32. La transcription des gènes hsp se fait donc essentiellement grâce au facteur σ70 (Gamer *et al.*, 1996). Lors d'une élévation de température, le taux de protéines dénaturées augmente dans la cellule. Du fait de la très forte affinité de la protéine DnaK pour les substrats dénaturés, le facteur σ32 se trouve libéré. Le recrutement de la protéine DnaK par les protéines dénaturées aura également pour effet de libérer l'ARN_m du gène *rpoH* et d'augmenter sa traduction. L'action combinée de l'élévation de température, agissant directement sur les éléments cis-régulateurs de l'ARN_m du gène *rpoH*, et du recrutement des protéines DnaK par les protéines dénaturées, va permettre l'induction de l'expression de tous les gènes de choc thermique. La production de molécules chaperons qui en résulte permettra l'autorégulation de la réponse au choc thermique en éliminant peu à peu le taux de protéines dénaturées dans la cellule.

Ce système de régulation est conservé chez un grand nombre de bactéries, néanmoins il n'est pas universel. Chez *Bradyrhizobium japonicum*, un facteur σ54, codé par le gène rpoN, régule l'activité de l'opéron *groE* (Babst *et al.*, 1996). Un autre système de régulation a enfin été décrit

chez certaines bactéries et notamment chez *Bacillus subtilis* (Li et Wong, 1992), *Clostridium acetobutylicum* (Narberhaus et Bahl, 1992) et *Mycobacterium leprae* (Mehra *et al.*, 1986). Ce système appelé CIRCE (Controlling Inverted Repeat of Chaperone Expression) fait intervenir des éléments répétés inversés très conservés et ayant une structure de deux fois neuf nucléotides séparés par neuf nucléotides. Les CIRCE sont généralement localisés entre le promoteur et le codon Start du gène, des mutations sur une des deux branches des séquences ont un effet activateur de la transcription. Il semble donc que les CIRCE soient des éléments répresseurs de la transcription, soit par effet stérique sur l'ADN (en formant une boucle qui bloque l'ARN polymérase), soit par fixation d'un répresseur spécifique (Van der Vies et Georgopoulos, 1996). Chez *Bacillus subtilis*, Schulz *et al.* (1995) ont mis en évidence des mutants ayant une délétion sur le gène orf39 et synthétisant de façon importante les protéines Hsp60 et Hsp70. Il est probable que le produit de ce gène soit effectivement l'élément répresseur des séquences CIRCE (Schumann, 1996).

A.5.3. Les protéines Hsp60 des bactéries intracellulaires et des endocytobiotes

A.5.3.1. Rôle des protéines Hsp60 dans les relations hôte-endocytobiotes

La production de protéines Hsp60 et Hsp70 a été observée chez de nombreuses bactéries parasites intracellulaires (Van der Vies et Georgopoulos, 1996). Ainsi, chez *Legionella pneumophila* et *Salmonella typhimurium*, la réponse cellulaire induite par choc thermique ou choc osmotique est très similaire à celle induite par l'entrée dans le milieu intracellulaire d'un macrophage parasité (Abshire et Neidhardt, 1993). Chez les endocytobiotes de l'amibe (Ahn *et al.*, 1991) et chez ceux de la mouche tsé-tsé (Aksoy, 1995), la production d'une telle protéine en quantité importante a également été montrée (§ 5.). Mais parmi tous les modèles d'endocytobiose, c'est la protéine Hsp60 de *Buchnera aphidicola*, l'endocytobiote primaire du puceron du pois *Acyrthosiphon pisum*, qui a certainement été la mieux décrite (Ishikawa, 1982a-b, 1984a-b, 1985, 1987 ; Ishikawa et Yamaji, 1985a-b ; Ishikawa et Hashimoto, 1986 ; Ishikawa *et al.*, 1986). Ces auteurs ont montré que *Buchnera* produit ce chaperon, appelé symbionine, en quantité très majoritaire lorsqu'elle est à l'intérieur de son hôte.

Le clonage et le séquençage du gène (symL) de la symbionine a permis de révéler son appartenance à la famille des Hsp60 (Ohtaka *et al.*, 1992). Ce gène est fonctionnel chez *Escherichia coli* et permet la complémentation de mutants *groEL*$^{-}$. La protéine a également été purifiée et a montré *in vitro* des propriétés de molécule chaperon, activités d'ATPase et de renaturation de substrats dénaturés (Morioka *et al.*, 1993 ; Morioka et Ishikawa, 1993). Les auteurs ont alors supposé que la protéine intervenait dans les mécanismes d'importation et d'exportation protéique ayant lieu entre l'hôte et ses endocytobiotes, mais aucune preuve directe n'a pour le moment été donnée.

Afin de découvrir un éventuel rôle spécifique de cette protéine dans la relation symbiotique, Morioka *et al*. (1992) ont recherché les différences existant entre la symbionine et GroEL. Il est ainsi apparu que les sous-unités de la symbionine se dissocient plus facilement en présence d'urée que les sous-unités GroEL. De plus, leur réassociation n'est pas influencée par la présence de symbionine native. Il semble donc que des différences existent entre ces deux molécules au niveau de leur structure quaternaire (Morioka et Ishikawa, 1993b). La symbionine possède une activité d'autophosphorylation qui lui permet de transférer l'énergie de la liaison phosphate de l'ATP à d'autres composés. *In vitro*, elle peut reformer du GTP et de l'ATP à partir du GDP et de l'ADP (Morioka *et al.*, 1993a). La protéine GroEL est également capable d'autophosphorylation (Sherman et Goldberg, 1992) mais pour le moment aucune activité de phosphotransférase n'a été découverte. L'activité phosphotransférase de la symbionine a conduit les chercheurs à rechercher des différences dans les structures primaires de ces deux protéines. Il s'est avéré que la symbionine possède deux résidus histidine substitués dans GroEL par des résidus alanine. Ainsi cette chaperonine pourrait avoir un deuxième rôle comparable à celui des protéines à histidine kinase des bactéries et pourrait participer aux échanges énergétiques entre l'hôte et ses endocytobiotes (Morioka *et al.*, 1993).

Enfin, un rôle très original pour la symbionine a été décrit chez le puceron *Myzus persicae* (Van den Heuvel *et al.*, 1994), et *Rhopalosiphum padi* (Filichkin *et al.*, 1997). La symbionine est excrétée par les endocytobiotes dans l'hémolymphe de ces deux insectes et participe au cycle de transmission de différents virus circulants en protégeant les particules virales de la protéolyse, depuis le tube digestif jusqu'aux glandes salivaires. Il est à noter qu'une protéine homologue des Hsp60 a été trouvée, associée aux particules du virus HIV dans des cellules humaines (Bartz *et al.*, 1994).

Il n'est pas surprenant d'observer la présence de protéines Hsp60 dans les divers endocytobiotes et bactéries parasites étudiés puisque cette protéine a un rôle physiologique essentiel à toutes les températures (Fayet *et al.*, 1989). Mais il est par contre plus étonnant que cette protéine de stress soit surproduite même dans des relations endosymbiotiques très anciennes et apparemment très stables. On peut noter à ce titre que les mitochondries stockent également une quantité importante de protéine Hsp60. L'induction de l’expression de protéine Hsp60 est peut-être liée à l'effort d'importation et d'exportation auquel la cellule symbiotique doit faire face. Mais elle

correspond peut-être simplement à une réponse au stress induit par le milieu intracellulaire qui malgré la longue coévolution est resté hostile à ces cellules étrangères.

A.5.3.2. Régulation des gènes *hsp60* chez les bactéries intracellulaires

Chez les endocytobiotes du puceron du pois (Ohtaka *et al.*, 1992) ainsi que chez *Legionella pneumophila* (Hoffman *et al.*, 1990), la régulation des gènes *hsp60* semble se faire sur le modèle classique à promoteurs σ32 et σ70 décrit chez *Escherichia coli* (§ A.5.2.). Il existe en plus chez *Buchnera* deux séquences inversées répétées (IR) de sept paires de bases, séparées par sept autres paires de bases. Cet ensemble est localisé entre les gènes *symL* et *symS*. Ces IR pourraient être des éléments de régulation positifs qui permettraient la synthèse préférentielle de *symL* par rapport à *symS* (Ohtaka *et al.*, 1992). Chez *Mycobacterium tuberculosis* le même type de régulation est observé mais les séquences inversées et répétées ont 21 nucléotides chacune et sont séparées par cinq nucléotides (Baird *et al.*, 1989).

Chez *Bradyrhizobium japonicum* la régulation des gènes *hsp60* est à la fois du type CIRCE et σ32. Cette régulation est extrêmement complexe et très partiellement élucidée. Non seulement les gènes *hsp60* sont multiples et localisés sur des mégaplasmides, mais les gènes *rpoH* appartiennent eux-aussi à une famille multigénique. L'aspect le plus intéressant de cette régulation par rapport au thème de ce travail réside dans le fait que les gènes responsables de la fixation de l'azote atmosphérique (gènes *nif*) sont corégulés avec ceux des *hsp60* (Babst *et al.*, 1996). Cette corégulation a également été montrée chez *Klebsiella pneumoniae* (Govezensky *et al.*, 1994).

Chez *Agrobacterium tumefaciens*, il a été montré que lors d'un choc thermique le taux de protéine Hsp60 augmente de façon très importante alors que le taux de Hsp10 reste faible dans la cellule. Une stabilité différentielle des deux ARNm *hsp10* et *hsp60* obtenus après clivage de l'ARNm polycistronique, a été sugérée pour expliquer ce phénomène (Segal et Ron, 1995).

Enfin, chez les endocytobiotes de l'amibe *Amoeba proteus*, l'opéron *xgroE* est sous le contrôle d'un promoteur classique Pσ32 (Ahn et Jéon, 1993), mais un autre type de promoteur extrêmement fort et fonctionnel chez *Escherichia coli* induit l'expression préférentielle de la protéine XGroEL par rapport à la protéine XGroES (Ahn *et al.*, 1994). Ce type de promoteur, situé à l'intérieur du gène *groES*, n'a pour le moment pas été trouvé chez d'autres organismes.

En conclusion de ce paragraphe, il apparaît que la régulation des gènes des bactéries symbiotiques possède au moins une caractéristique propre : l'induction préférentielle du gène *hsp60* par rapport au gène *hsp10*. Les organismes ont apparemment tous développés des mécanismes très diversifiés pour atteindre ce même but. Les modèles de fonctionnement du complexe GroE les plus récents (§ A.5.1.3.) montrent la nécessité d'un rapport stoechiométrique de 2:1 respectivement pour les molécules GroEL et GroES dans la cellule. Néanmoins il a été montré que la protéine GroEL seule est capable d'une activité chaperon *in vitro* (Hendrick et Hartl, 1993). De plus la surproduction de la protéine GroES s'est avérée toxique pour la cellule (Zeilstra-Ryalls *et al*., 1991). Il est probable que cet effet toxique de GroES soit responsable de l'invention de ces mécanismes de régulation particuliers chez les organismes intracellulaires.

PARTIE B

MATERIEL ET METHODES

B.1. ELEVAGE DES CHARANÇONS ET SOUCHES UTILISEES

Les différentes souches sont élevées sur du blé, dans une étuve ventilée, à la température de 27,5°C et à 70 % d'humidité relative, selon la méthode décrite par Laviolette et Nardon (1963).

La durée de vie moyenne d'un charançon est d'environ trois mois. Afin de disposer en permanence d'individus de chaque stade et de même âge dans l'élevage, des adultes (âgés de deux à six semaines) sont mis à pondre et changés ensuite tous les deux jours.

L'espèce *Sitophilus oryzae* a été principalement utilisée dans ce travail. La souche d'origine, appelée SFr, provient des "entrepôts frigorifiques lyonnais" (1959). La souche aposymbiotique dérivée a été obtenue par traitement de SFr un mois à 35°C et 90 % d'humidité relative (Nardon, 1973).

Enfin, trois autres espèces de *Sitophilus* ont été utilisées : *Sitophilus granarius*, *Sitophilus zeamais* et *Sitophilus linearis*. Cette dernière espèce, naturellement asymbiotique, est élevée sur graines de tamarin.

B.2. PURIFICATION DES ENDOCYTOBIOTES DE *SITOPHILUS ORYZAE*

Des larves de quatrième stade sont isolées des grains de blé. Après décapitation des insectes, les bactériomes sont disséqués sous la loupe binoculaire. Ceux-ci sont alors broyés au potter dans un tampon Y(1) [NaCl 200 mM ; KCl 20 mM ; $CaCl_2$ 3,5 mM ; $NaHCO_3$ 2,5 mM ; NaH_2PO_4 0,1 mM ; glucose 5mM ; lévulose 2 mM ; maltose 40 mM]. Le broyat est filtré sur mousseline et centrifugé (300 g, 5 min, 4°C). Le surnageant est alors déposé sur une solution de Percoll [Saccharose 250 mM ; Polyéthylène glycol 6 000 (PEG) 0,5 % (p/v) ; Ficoll 0,1 % (p/v) ; Percoll 36 % (v/v) dans du tampon Y] et centrifugé (12 000 g, 15 min, 4°C). L'anneau d'endocytobiotes, formé dans la partie inférieure du tube, est prélevé et dilué dans du tampon Y. Les endocytobiotes sont finalement sédimentés par centrifugation (12 000 g, 10 min, 4°C).

Ce protocole a été élaboré par Heddi *et al.* (1991). Les auteurs ont par ailleurs vérifié la pureté du culot d'endocytobiotes en microscopie électronique.

---

(1) tampon physiologique dérivé de celui mis au point par Yeager (Nardon, 1978).

B.3. TECHNIQUES BIOCHIMIQUES

B.3.1. Immunohistochimie sur coupes microscopiques

Cette technique d'immunohistochimie consiste à révéler la présence d'antigènes protéiques (Hsp60 et Hsp10 dans ce travail) sur des coupes microscopiques grâce à des anticorps spécifiques.

L'anticorps polyclonal anti-Hsp60 utilisé a été fabriqué par injection de la protéine GroEL d'*Escherichia coli* à un lapin selon la procédure décrite par Hara et Ishikawa (1990). Cet anticorps nous a été gracieusement fourni par les auteurs que nous remercions chaleureusement. L'anticorps polyclonal anti-Hsp10 (lapin) est d'origine commerciale (SIGMA).

Les larves de quatrième stade et les ovaires d'adultes sont fixés dans une solution de Bouin alcoolique, avant d'être inclus dans de la paraffine. Des coupes de 5 µm d'épaisseur sont montées sur des lames recouvertes de poly-L-lysine agissant comme colle. L'immunomarquage est réalisé grâce au Kit "Vectastain Elite ABC" (Vector).

Les coupes sont déparaffinées et réhydratées par des bains successifs de xylène, éthanol et eau, elles sont incubées 30 minutes dans du méthanol avec 2 % d'H_2O_2 afin d'éliminer les péroxydases endogènes. Elles sont ensuite rincées 20 minutes dans un tampon TT [Tris-HCl 20 mM (pH = 7,4) ; NaCl 150 mM] et incubées 20 minutes dans le tampon TT contenant 2 % de sérum normal de chèvre (TT-SNC) afin de masquer les éventuels sites non spécifiques. Les coupes sont alors mises en présence de l'anticorps anti-GroEL (dilué à 1/40 000) ou de l'anticorps anti-GroES (dilution à 1/200) dans du TT-SNC (ou pour les témoins de spécificité, en présence de sérum de lapin préimmun dilué à 1/40 000 dans le TT-SNC).

Un rinçage de 10 minutes dans le TT-SNC est ensuite effectué avant une incubation de 30 minutes dans du TT-SNC contenant l'anticorps secondaire biotinylé chèvre anti-IgG-lapin. Après un autre rinçage de 10 minutes dans le TT-SNC, le complexe biotine-péroxidase en solution dans le TT (réactif ABC) est mis en contact pendant 30 minutes.

A ce stade, L'antigène est couplé à la péroxydase sur les coupes. Après lavage dans le TT-SNC, le substrat diaminobenzidine [DAB 0,4 % (v/v) ; H_2O_2 0,1 % (v/v) dans l'eau distillée] est ajouté. Après 10 minutes d'incubation, les coupes sont rincées à l'eau avant de faire une coloration de fond au bleu de toluidine (1 ‰ ; pH = 4,5).

B.3.2. Dosage ELISA

Le dosage sur plaque ELISA est une technique qui permet de doser la quantité d'antigènes présente dans un broyat grâce à des anticorps spécifiques. Les échantillons sont broyés dans un tampon [Carbonate de Sodium 0,1 M (pH = 9,5)] et 100 µl de broyat sont déposés dans les puits.

Les protéines s'adsorberont sur la plaque en 12 heures à 4°C. La plaque est ensuite rincée dans un tampon PBS-TG [PBS 10 mM ; KCl 27 mM ; NaCl 137 mM ; Tween 20 0,1 % (v/v) ; Gélatine 0,5 % (p/v)]. Tous les lavages ultérieurs sont faits en triple dans du PBS-TG. Les sites non spécifiques sont ensuite bloqués par incubation (30 min à 37°C) dans une solution de PBS-TG contenant 2 % de sérum normal de chèvre SNC (PBS-TG-SNC). L'anticorps primaire dilué au 1/40 000 dans du TBS-TG-SNC (ou le sérum de lapin non spécifique à la même dilution pour les témoins) est ajouté (30 min à 37°C). Après lavage de la plaque, l'anticorps secondaire biotinylé (Kit Vectastain Elite ABC) est ajouté (30 min à 37°C). La plaque est rincée 5 fois avant l'ajout de 100 µl par puits d'une solution d'avidine à 0,1 µg/ml dans du PBS-TG-SNC dont la concentration en NaCl a été élevée à 0,5 M (1 heure à 37°C). La plaque est ensuite rincée, avant l'ajout de 100 µl par puits d'une solution d'hydroxypéroxidase biotinylée à 0,1 µg/ml dans du PBS-TG-SNC (1 heure à 37°C). Après rinçage, 100 µl de solution du substrat (solution B du kit) sont ajoutés et la coloration apparaît en 10 minutes à température ambiante. Les résultats sont finalement lus au spectrophotomètre à 630 nm.

B.3.3. Chromatographie sur DEAE-cellulose

Cette technique de chromatographie liquide à basse pression est couramment utilisée pour la séparation des protéines. Dans ce travail, elle a été utilisée pour purifier la protéine Hsp60 des endocytobiotes de *Sitophilus oryzae*. La matrice de la colonne est constituée de billes de DEAE-cellulose (Sigma 0,99 meq/g D0909) sur lesquelles sont greffés des groupements positifs. A pH fixé, les protéines globalement chargées négativement pourront venir se fixer sur la matrice. Ce type de matrice est, pour cette raison, appelée "échangeur d'anions".

Pour décrocher sélectivement les protéines de la matrice, afin de les récupérer en sortie, deux techniques peuvent être utilisées : (1) le pH du milieu est modifié, ce qui entraîne une modification des charges des protéines et leur décrochage ; (2) la charge ionique est modifiée, ce qui apporte des ions de même charge et chasse les protéines fixées. En fonction de leur affinité les protéines sont décrochées et éluées successivement.

B.3.3.1. Préparation des échantillons

Les endocytobiotes, issus d'un minimum de 1000 larves de quatrième stade, sont purifiés selon le protocole décrit au chapitre 2. Le culot isolé est congelé (24 heures minimum) dans l'azote liquide puis réchauffé brutalement par l'ajout de 500 µl de tampon T à 37°C [Tris 50 mM ; NaCl 100 mM (pH = 7,5)]. Un volume de 25 µl de toluène est alors ajouté et la solution est agitée vigoureusement (Vortex) pendant une minute. Environ 150 µl de billes de verre (Glass beads 150-212 µm, Sigma) sont alors ajoutés. La solution est congelée dans l'azote liquide pendant une minute puis décongelée rapidement (37°C) et agitée vigoureusement (Vortex pendant 1 minute). Cette opération de congélation - décongélation est répétée trois fois.

Les billes sont alors retirées et rincées par 500 µl de tampon T qui sont finalement rajoutés aux 500 µl initiaux. La solution est alors centrifugée (7 000 g, 30 min, 4°C) et le surnageant est conservé à - 20°C.

B.3.3.2. Préparation de la colonne

Avant de remplir la colonne, la résine est traitée en "batch" dans des bains successifs (30 min) d'eau distillée, de NaOH 50 mM et d'HCl 50 mM. Entre chaque bain, la résine est récupérée par filtration sur Buchner et rincée abondamment à l'eau distillée. La résine est finalement suspendue dans le tampon T jusqu'à son équilibration à pH = 7,5. Après dégazage, le gel est coulé et tassé dans une colonne de 9 mm de diamètre pour 90 mm de hauteur. Une pompe péristaltique en sortie de colonne permet de régler le débit à 0,25 ml/min. Enfin, un détecteur (LC detector 111, Gilson) permet de mesurer la sortie des pics protéiques à 280 nm.

B.3.3.3. Chromatographie

Le protocole utilisé est une adaptation de la procédure décrite par Maeda *et al.* (1994) pour la purification de la protéine Hsp60 de *Porphyromonas gingivalis*. Un gradient de NaCl (100 à 800 mM) est réalisé dans un tampon [50 mM Tris HCl (pH = 7,5)] et les pics sont collectés individuellement dans des tubes en sortie de colonne. Ils sont ensuite concentrés par filtration sur membrane de dialyse (SYM10, Amicon) et les contenus protéiques sont testés par électrophorèse monodirectionnelle selon le protocole décrit au § B.3.5.1.

A la fin de chaque chromatographie, la résine est rincée dans une solution d'HCl 50 mM puis rééquilibrée dans le tampon T jusqu'à l'obtention du pH = 7,5 en sortie de colonne.

B.3.4. Chromatographie liquide à haute performance (HPLC)

L'HPLC a été utilisée dans le but d'estimer le pourcentage de C+G de l'ADN génomique des endocytobiotes de *Sitophilus oryzae*. De nombreuses autres méthodes ont été développées pour mesurer ce taux de C+G : (1) la dénaturation thermique de l'ADN (Marmur et Doty, 1962) ; (2) la densitométrie sur gradient de chlorure de césium (Schildkraut *et al.*, 1962) ; (3) la fluorométrie (fluorochrome AT-spécifique Hoechst 33258) couplée à la cytométrie en flux (Vinogradov, 1994) et (4) l'HPLC après marquage radioactif des nucléotides (Krane *et al.*, 1991) ou après hydrolyse enzymatique des nucléotides (Gehrke *et al.*, 1984).

Parmi toutes ces techniques, seules les méthodes d'HPLC sont apparues réalisables au laboratoire. Après des essais infructueux d'hydrolyse enzymatique de l'ADN, une méthode de séparation et de dosage des bases de l'ADN, par hydrolyse chimique à l'acide formique, a été

mise au point. Cette technique est une adaptation d'une des premières techniques d'analyse de l'ADN par chromatographie sur papier : la méthode de Whyatt (citée dans Loiseleur, 1963).

B.3.4.1. Préparation des échantillons d'ADN

Les endocytobiotes de *Sitophilus oryzae* sont purifiés selon le protocole décrit au paragraphe B.2. Des cultures d'*Escherichia coli* (37°C), de *Bacillus subtilis* (37°C) et de *Pseudomonas fluorescens* (25°C) sont réalisées en milieu liquide BL (§ B.4.2.) pendant une nuit. Les bactéries sont alors culottées par centrifugation (7 000g, 5 min, 4°C). Elles sont incubées dans un tampon de lyse [Tris HCl 100 mM (pH = 8,0) ; NaCl 100 mM ; EDTA 100 mM ; sodium dodécyl sulfate (SDS) 1 % (p/v) ; protéinase K 1 % (p/v)] à 42°C pendant trois heures. Pour la souche Gram positive *B. subtilis*, une étape de traitement aux ultra sons (1 minute, 50 W, 4°C) est ajoutée avant l'incubation. Les acides nucléiques sont alors extraits au phénol/chloroforme, puis traités 2 heures à 37°C à la RNAse A (100 µg/ml). L'ADN est ensuite extrait au phénol/chloroforme et précipité à l'éthanol 100 % à - 20°C. Après centrifugation (7 000 g, 15 min, 4°C), le culot d'ADN est rincé à l'éthanol 70 % et centrifugé à nouveau (7 000 g, 5 min, 4°C). L'ADN est alors séché sous vide avant hydrolyse.

B.3.4.2. Hydrolyse chimique

Le culot d'ADN est dissous dans 100 µl d'acide formique 88 % (v/v), la concentration finale ne devant pas excéder 5 µg/ml. L'hydrolyse est réalisée à 175°C en 30 minutes sous atmosphère résiduelle d'azote. Ce "vide d'azote" est obtenu par la succession d'une dizaine de remplissages d'azote et de mises sous vide de la cuve à hydrolyse, avant la réalisation du vide final (0,1 atm).

Après hydrolyse, les échantillons sont repris dans le tampon A d'HPLC [H_2O, Acide heptane sulfonique 0,1 % (p/v) ; HCl fumant 30 µl/l] à une concentration (en ADN) d'environ 10 ng/µl.

B.3.4.3. HPLC

Les échantillons (100 µl) sont injectés dans un appareil MT2 (Kontron) possédant un détecteur de diode. Une colonne 250 x 46 remplie de résine C18 (4 µm, Sphérisorb) est utilisée. Les bases de l'ADN sont éluées par un gradient de solvant A [H_2O, Acide heptane sulfonique 0,1 % (p/v) ; HCl fumant 30 µl/l] et de solvant B [méthanol ; acide heptane sulfonique 1% (p/v) ; HCl fumant 30 µl/l]. Le gradient démarre (t = 0) à 20 % de solvant B et monte à 40 % en 3 min. Entre t = 6 min et t = 9 min le gradient atteint 60 % de solvant B. Les pics enregistrés à 260 nm sont intégrés pour une estimation quantitative en utilisant comme référence les échantillons d'ADN de taux de C+G connus. Les temps de rétention, les étapes du gradient et les spectres correspondants sont décrits dans la partie Résultats et Discussion (§ C.1.3.).

B.3.5. Electrophorèse

B.3.5.1. Electrophorèse monodirectionnelle (SDS-PAGE)

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 et au ß-mercapto-éthanol (100°C, 2 min) permet d'une part la dissociation des sous-unités des protéines oligomériques, et d'autre part l'adsorption d'un grand nombre d'ions dodécylsulfates chargés négativement sur tous les monomères. La mobilité électrophorétique de ces complexes protéine-SDS dépend donc uniquement du poids moléculaire des monomères qui sont déterminés par comparaison avec la mobilité de protéines étalons.

B.3.5.1.1. PREPARATION DES ECHANTILLONS

Les tissus (larves, endocytobiotes) sont broyés au potter deux minutes à 4°C dans une solution de broyage B [NaCl 200 mM ; KCl 20 mM ; $CaCl_2$ 3,5 mM ; $NaHCO_3$ 2,5 mM ; NaH_2PO_4 0,1 mM ; glucose 5mM ; lévulose 2 mM ; maltose 40 mM ; phénylthiourée (PTU) à saturation ; fluorure de phényl méthyl sulfonyl (PMSF) 5,5 µM ; acide éthylènediamine tétraacétique (EDTA) 160 µM ; pepstatine 30 µM ; antipain 35 µM]. Une centrifugation légère (800 g, 3 min, 4°C) permet l'élimination des globules de protéines de stockage insolubles (Delobel *et al.*, 1993). Le surnageant est alors repris dans un volume égal de solution de dépôt [Tris HCl 100 mM (pH = 6,8) ; glycérol 30 % (v/v); SDS 4% (p/v) ; 2-ß-mercaptoéthanol 100 mM ; bleu de bromophénol 0,05 % (p/v)].

B.3.5.1.2. PREPARATION DES GELS D'ACRYLAMIDE

Un gel de séparation est coulé entre deux plaques de verre sur une hauteur d'environ 15 cm pour 1 mm d'épaisseur. Le gel est recouvert d'alcool isoamylique pour assurer la planéité de sa surface. A titre indicatif, un gel à 12 % est constitué de 6,7 ml d'eau, 5 ml de Tris-HCl 1,5 M (pH 8,8), 0,2 ml de SDS 10 %, 8 ml d'acrylamide/bisacrylamide (30 % / 8 %), 100 µl de persulfate d'ammonium et 10 µl de TEMED. Après polymérisation, l'alcool est éliminé et la surface du gel est séchée. Le gel de concentration est coulé sur une hauteur de 1 cm. Il est surmonté d'un peigne qui sera oté après polymérisation. Ce gel est composé de 12,2 ml d'eau, 5 ml de Tris-HCl 0,5 M (pH 6,8), 200 µl de SDS 10 %, 2,6 ml d'acrylamide/bisacrylamide (30 % / 0,8 %), 100 µl de persulfate d'ammonium 10 % et 20 µl de TEMED. Après rinçage des puits à l'eau, 10 à 20 µl d'échantillon sont déposés.

B.3.5.1.3. CONDITIONS D'ELECTROPHORESE

Les gels sont montés dans un appareil à électrophorèse (Mini PROTEAN I, BioRad) et la cuve est remplie de tampon de migration [Tris HCl 25 mM ; glycine 200 mM ; SDS 0,1 % (p/v)]. L'électrophorèse est conduite à tension constante (200 V) pendant 50 minutes environ, jusqu'à l'arrivée en bas du gel du front de migration visualisé par le bleu de bromophénol.

B.3.5.1.4. COLORATION AU BLEU DE COOMASSIE

Les gels sont placés 20 minutes dans le colorant [R-brillant blue (Sigma) 0,2 % (p/v) ; acide acétique 10 % (v/v) ; méthanol 40 % (v/v)] à 37°C sous agitation. La décoloration se fait dans deux bains (10 min) de solution de décoloration [acide acétique 10 % (v/v) ; méthanol 40 % (v/v)]. Puis les gels sont conservés une nuit au minimum dans la solution de conservation [acide acétique 10 % (v/v) ; méthanol 5 % (v/v)] avant d'être séchés sur un papier bristol, 1 heure 30 à 60°C, à l'aide d'un sécheur de gel (LKB).

B.3.5.1.5. COLORATION A L'ARGENT (BLUM *ET AL.*, 1987)

Les gels sont tout d'abord fixés 12 heures dans un mélange méthanol/acide acétique/formaldéhyde (50/12/38 %). Ils sont ensuite lavés (3 x 20 min) dans l'éthanol 50 %, puis prétraités avec du thiosulfate de sodium (1mM) pendant 1 minute. Après trois rinçages de 20 secondes à l'eau distillée les gels sont imprégnés (20 min) dans une solution d'argent [$AgNO_3$ 12 mM ; formaldéhyde 0,15 ‰ (v/v)]. Après 3 rinçages de 20 secondes, le développement est effectué dans une solution [carbonate de sodium (Na_2CO_3) 0,57 M ; thiosulfate de sodium (Na_2SO_3) 17 µM ; formaldéhyde 0,15 ‰ (v/v)]. Le temps de développement varie de 2 à 10 minutes en fonction de la quantité protéique présente dans le gel. Cette technique est capable de déceler des quantités de l'ordre de quelques nanogrammes de protéines. Le développement est stoppé par lavage dans l'eau distillée (2 x 2 min) puis dans une solution méthanol/acide acétique (50/12 %) pendant 10 minutes. Les gels sont ensuite stockés avant séchage dans une solution de méthanol 50 % (v/v).

B.3.5.2. Electrophorèse bidimensionnelle (IEF - SDS PAGE)

B.3.5.2.1. PRINCIPE

L'électrophorèse bidimensionnelle permet la séparation de protéines selon deux paramètres physico-chimiques : le pH isoélectrique (pHi) et la masse moléculaire (PM). La migration en première dimension (IEF) se fait verticalement dans des capillaires en verre (mini PROTEAN I, BioRad). La deuxième dimension s'effectue ensuite perpendiculairement sur un gel d'acrylamide à 12 % selon la technique de Laemmli (SDS-PAGE) décrite précédemment (§ B.3.5.1.).

B.3.5.2.2. PREPARATION DES ECHANTILLONS

Les larves sont isolées des grains et broyées à 4°C au potter dans la solution B (§ B.3.5.1.1.). Le broyat est centrifugé (800 g, 3 minutes, 4°C) et les protéines du surnageant sont précipitées pendant une nuit dans 5 volumes d'acétone à -30°C. Une centrifugation (9 000 g, 10 min, 4°C) permet de récupérer un culot protéique qui est lyophilisé et conservé à - 20°C. Cinq à 25 µg de protéines lyophilisées sont solubilisés dans 25 µl de solution de dépôt [urée 9 M ; triton X-100 1 % (v/v) ; dithiothréitol 5 % (v/v) ; ampholyte 5-7 4 % (v/v) ; ampholyte 3-10 2 % (v/v)] pendant une nuit à 4°C. Une centrifugation (7 000 g, 3 min, 4°C) est effectuée avant le dépôt.

B.3.5.2.3. ISOELECTROFOCALISATION

Les gels [urée 9,2 M ; acrylamide 6 % ; bisacrylamide 0,3 % ; triton X-100, 2 % ; ampholyte 5-7 1,6 % ; ampholyte 3-10 0,4 % ; persulfate d'ammonium 0,02 % (p/v) ; TEMED 0,2 % (v/v)] sont coulés dans des capillaires de 10 cm de long pour 0,75 mm de diamètre.

Ils sont montés dans l'appareil à électrophorèse (BioRad, mini PROTEAN I). Les cuves supérieure et inférieure sont remplies de tampon : H_3PO_4 10 mM à l'anode et NaOH 20 mM à la cathode. Une pré-électrofocalisation est effectuée (200 V, 10 min ; 300 V, 15 min et 400 V, 15 min) de façon à éliminer les produits non polymérisés et à former le gradient d'ampholines.

Les tampons sont alors renouvelés et l'électrophorèse est conduite pendant 10 minutes à 500 V, puis 3 heures 30 à 750 V. Il est à noter que les 25 µl d'échantillons sont recouverts de 20 µl d'une solution "d'overlay" [urée 9 M ; ampholyte 5-7 2 % (v/v) ; ampholyte 3-10 1 % (v/v)]. Cette solution protège l'échantillon de l'agressivité de la soude à la cathode.

B.3.5.2.4. ÉQUILIBRATION

Les capillaires sont démoulés dans un bécher rempli de solution d'équilibration [Tris-HCl 62 mM (pH = 6,8) ; SDS 2 % (p/v) ; ß-mercaptoéthanol 5 % (v/v) ; bleu de bromophénol 0,05 % (p/v)] pendant une minute. Le SDS pénètre dans le capillaire pour se fixer sur les protéines et permettre ainsi la deuxième migration (SDS-PAGE).

B.3.5.2.5. DEUXIEME DIMENSION (SDS-PAGE)

Les capillaires sont déposés sur la surface du gel (12 % d'acrylamide ; 0,3 % de bisacrylamide) et l'électrophorèse est réalisée selon le protocole décrit au paragraphe B.6.5.1. Les gels sont également colorés et décolorés comme indiqué précédemment (bleu de Coomassie ou argent).

B.3.5.3. Western blot

B.3.5.3.1. MARQUAGE IMMUNOLOGIQUE

Après l'électrophorèse, les protéines du gel d'acrylamide doivent être transférées sur une membrane de nitrocellulose (Bio Bind-NC, 0,2 microns, Whatman) pour la réalisation de

l'immunomarquage. L'électrotransfert est réalisé dans un appareil BioRad (transfert blot) pendant 4 heures 30 à 40 V dans du tampon de transfert [acide orthoborique 50 mM ; Tris 50 mM]. Tout le reste de la manipulation est réalisé à 37°C avec le kit "Vectastain Elite ABC".

Les membranes sont saturées pendant une nuit dans du lait en poudre écrémé (Régilait) à 5 % p/v dans du tampon Tris (TT) [20 mM Tris-HCl (pH = 7,4) ; 150 mM NaCl] contenant 0,1 % (v/v) de Tween 20 (TT-Tween). Elles sont ensuite rincées 5 minutes dans le TT-Tween, puis incubées 10 minutes dans du TT-Tween contenant 150 µl/ml de sérum normal de chèvre (TT-Tween-SNC). Les membranes sont alors incubées une heure avec l'anticorps anti-GroEL dilué au 1/10 000 dans le TT-Tween-SNC ou avec du sérum normal de lapin, à la même dilution, pour les témoins. Après quatre rinçages successifs de 5 minutes dans le TT-Tween, les membranes sont incubées 30 minutes avec l'anticorps secondaire biotinylé préparé dans le TT-Tween-SNC. Une deuxième série de 4 rinçages de 5 minutes est effectuée, et les membranes sont incubées 30 minutes en présence du réactif ABC, dont la concentration en NaCl a été augmentée à 0,45 M pour limiter les bandes non spécifiques. Un dernier rinçage (4 x 5 minutes) est nécessaire avant d'ajouter le substrat Diaminobenzidine [0,4 % DAB (v/v) ; 0,1 % H_20_2 (v/v)] pendant 3 minutes. Les membranes sont finalement rincées à l'eau et séchées à l'air ambiant.

B.3.5.3.2. MARQUAGE DES PROTEINES NEOSYNTHETISEES

B.3.5.3.2.1. Marquage des larves

Les larves de quatrième stade sont extraites des grains de blé et isolées, afin d'éviter qu'elles se perforent en se mordant. Des injections de méthionine marquée au ^{35}S (Amersham, 940 Ci/nmol) sont pratiquées sous la loupe binoculaire, à l'aide d'un micro-manipulateur et d'un capillaire en quartz gradué. Des volumes de 200 nl (3 µCi) de méthionine sont injectés dans la partie postérieure de chaque larve. Un témoin de mortalité est effectué en injectant à 20 larves, 200 nl de méthionine froide dans le tampon de solubilisation [Tris 50mM ; ß-mercapto-éthanol 2 % (v/v)]. Les larves sont ensuite recouvertes de farine et replacées à 27,5°C et 75 % d'humidité. Trois heures plus tard, les larves mortes sont éliminées (environ 1/4) et les autres sont broyées dans la solution B (§ B.3.5.1.1). Les protéines sont ensuite précipitées à l'acétone et mises en solution pour l'électrophorèse comme décrit précédemment.

B.3.5.3.2.2. Marquage des bactériomes et des endocytobiotes isolés

Les bactériomes sont disséqués, sous la loupe binoculaire, dans la solution B (§ B.3.5.1.1) et les endocytobiotes sont isolés selon le protocole décrit au paragraphe B.2. Le matériel est centrifugé et repris dans un milieu minimum de survie MSM [mannitol 250 mM ; pyruvate 5mM ; malate 5 mM ; ADP 2 mM ; ATP 2 mM ; GTP 0,5 mM ; KCl 20 mM ; KH_2PO_4 10 mM ; $MgCl_2$ 5 mM ; EDTA, 1 mM ; acides aminés (sauf méthionine) 0,1 mM ; albumine bovine 0,4 % (p/v)]. La méthionine ^{35}S est alors ajoutée (45 µCi/ml) et les échantillons sont placés pendant une heure à 27,5°C sous légère agitation. Les bactériomes et les endocytobiotes

sont ensuite rincés dans du MSM puis les protéines sont précipitées à l'acétone et traitées pour l'électrophorèse.

B.3.5.3.2.3. Révélation des gels par fluorographie.

Les gels sont fixés 30 minutes dans une solution à 40 % v/v de méthanol et 10 % v/v d'acide acétique. Puis ils sont incubés 2 x 30 minutes dans du DMSO (diméthyl sulfoxyde) afin d'éliminer l'eau, et enfin 1 heure 30 dans du DMSO contenant 22,2 % de scintillant PPO (2,5 diphényl-oxasol). Les gels sont alors rincés à l'eau (ils deviennent opaques) et séchés au sécheur de gel LKB (1 heure 30 à 60°C) entre du cellophane et du bristol. Ils sont finalement placés sur un film (Hyper film MP, Amersham) dans une cassette pour autoradiographie. Le film est exposé à - 80°C de 12 heures à 4 jours, puis révélé et fixé en chambre noire (révélateur et fixateur Kodak).

B.3.6. Phosphorylation des protéines *in vivo*

Des bactériomes sont disséqués à partir de larves de *Sitophilus oryzae* au quatrième stade et incubés une heure dans un milieu de survie contenant les 20 acides aminés essentiels à 5 mM, du saccharose à 96 mM, des vitamines [quantités pour 100 ml : acide p-aminobenzoïque, 1,6 mg ; acide L-ascorbique, 16 mg ; biotine, 0,016 mg ; D-pantothénate de calcium, 0,83 mg ; chlorure de choline, 8,3 mg ; acide folique, 0,16 mg ; inositol anhydre, 8,3 mg ; amide nicotinique, 1,6 mg ; pyridoxine HCl, 0,42 mg ; riboflavine, 0,083 mg ; triamine HCl, 0,42 mg] et des sels [$CuSO_4$, 3 µM ; $FeCl_3$, 30 µM ; $MnCl_2$, 6 µM ; NaCl, 94 µM ; $ZnCl_2$, 11 µM ; citrate de calcium, 37 µM ; benzoate de cholestérol, 9 µM ; $MgSO_4$, 2,4 mM ; KH_2PO_4, 1 mM]. Les bactériomes sont ensuite centrifugés (2000g, 1 min, 4°C) et repris dans 1 ml de milieu de survie contenant 0,6 µM de γ-^{32}P-ATP (20 µCi, Amersham). Ils sont incubés de une à six heures sous agitation légère à 27°C, puis centrifugés (2000g, 1 min, 4°C) et repris dans 25 µl de solution de dépot pour électrophorèse monodirectionnelle (§ B.3.5.1.). L'électrophorèse est conduite de façon classique et les gels sont colorés au bleu de Coomassie avant l'autoradiographie.

B.4. TECHNIQUES DE BIOLOGIE MOLECULAIRE

B.4.1. Souches bactériennes et plasmides utilisés

Les souches bactériennes et les plasmides utilisés sont décrits dans le tableau B.4.1.

Tableau B.4.1: Souches et plasmides utilisés (1) Laboratoire de Génétique Moléculaire des Microorganismes et des Interactions Cellulaires UMR CNRS 5577, INSA 406)

Souches	Caractéristiques principales	Source ou référence
Escherichia coli NM 522	supE thi (lac-proAB) hsd5 (r^-m^-) (F' proAB $lacI^qZ?M15$)	LGMMIC (1)
Pseudomonas fluorescens	type sauvage	LGMMIC (1)
Bacillus subtilis	type sauvage	LGMMIC (1)
OFB 858	zje::Km^R zjd::Tn10 Tet^R	Fayet *et al.*, 1993
OFB820	zje::Km^R *groES* 619	Fayet *et al.*, 1993
Plasmides		
pUC18	Amp^R	Boehringer
pMOS*Blue*	Amp^RTet^R	Amersham
p602	dérivé de pACYC184 portant l'opéron *groE* d'*Escherichia coli*	Fayet *et al.*, 1993
Sym I	dérivé de pUC18 portant un fragment *KpnI-BamHI* de 700 pb (portion codante du gène *hsp60* des endocytobiotes de *Sitophilus oryzae*)	Ce travail
SymIII	dérivé de pMOS*Blue* portant un fragment de 1 971 pb (partie codante de l'opéron *groE* des endocytobiotes de *Sitophilus oryzae*)	Ce travail
SymIV	dérivé de pMOS*Blue* portant un fragment de 1 571 pb (portion codante du gène *hsp60* des endocytobiotes de *Sitophilus oryzae*)	Ce travail
SFr23	dérivé de pMOS*Blue* portant un fragment de 1 625 pb (portion du gène *rrs* des endocytobiotes de *Sitophilus oryzae*.)	Heddi, communication personnelle

B.4.2. Conditions de culture et de conservation des souches

Les cultures en milieu liquide sont faites en milieu BL [NaCl 10 g/l ; bactotryptone 10 g/l ; extrait de levure 5 g/l (pH = 7)]. Les milieux solides contiennent 15 g d'agar par litre de milieu. Les antibiotiques sont ajoutés aux différents milieux de culture aux concentrations finales suivantes : ampicilline 100 mg/l ; tétracycline 10 mg/l ; chloramphénicol 20 mg/l.

Les souches bactériennes sont conservées à - 70°C dans leur milieu de culture additionné de glycérol (15 % v/v) ou de DMSO à 0,98 M.

B.4.3. Extraction d'ADN plasmidique

Cette méthode d'extraction d'ADN plasmidique est utilisée en routine au laboratoire. Les cellules issues de 1,5 ml d'une culture de nuit en BL sont culottées par centrifugation (10 000 g, 2 min, 4°C). Le surnageant est éliminé puis 100 µl de solution I [Tris-HCl 25 mM (pH = 8,0) ; EDTA 10 mM ; glucose 50 mM] sont ajoutés pour reprendre le culot cellulaire. Après 5 minutes

d'incubation, 200 µl de solution II [NaOH 0,2 M ; SDS 1% (p/v)] permettent la lyse des cellules. Après 5 minutes dans la glace, 150 µl de solution III [acétate de sodium 3 M (pH = 4,8)] sont ajoutés et le mélange est incubé 10 minutes sur la glace. Cette étape permet la précipitation de l'ADN chromosomique dénaturé par la soude et des protéines complexées par le SDS. L'ADN plasmidique sous forme surenroulée n'est pas précipité. Après centrifugation (10 000 g, 10 min, 4°C), le surnageant contenant l'ADN plasmidique est récupéré. 500 µl de phénol/ chloroforme/alcool isoamylique [25/24/1(v/v)] sont ajoutés au surnageant, les tubes sont agités vigoureusement une minute et centrifugés (7 000 g, 5 min, 4°C). La phase organique contenant l'ADN est précipitée par l'ajout de 2,5 volumes d'alcool absolu et par centrifugation (10 000 g, 10 min, 4°C). Le culot est lavé à l'éthanol 70 %, séché sous vide et repris dans 50 µl d'eau stérile contenant de la RNAse A (100 µg/ml , Boehringer) afin d'éliminer les ARN résiduels.

L'ADN obtenu est analysé par électrophorèse en gel d'agarose, après digestion par des endonucléases de restriction appropriées.

B.4.4. Digestion, ligature, électrophorèse et isolement des brins d'ADN

B.4.4.1. Digestion par des enzymes de restriction

Les endonucléases de restriction reconnaissent des séquences spécifiques d'ADN double brin et coupent cet ADN à l'intérieur ou à proximité de ces séquences. Pour que leur activité soit optimale, ces enzymes doivent être utilisées dans le milieu d'incubation et à la température recommandée par les fournisseurs (le plus souvent 2 heures à 37°C). La réaction peut être arrêtée en transférant les tubes de digestion dans la glace, en extrayant l'enzyme au phénol, ou encore en inactivant les enzymes par la chaleur (68°C, 10 min).

B.4.4.2. Ligature des brins d'ADN

La ligature de fragments d'ADN est réalisée grâce à la DNA ligase du phage T4, qui crée un pont phosphodiester entre le groupement phosphate de l'extrémité 5' et le groupement hydroxyl de l'extrémité 3' de l'ADN. Dans le milieu réactionnel sont ajoutés 0,1 volume de tampon ligase concentré 10X, 1 à 2 unités de T4 DNA ligase, l'ADN vecteur et l'ADN insert (dans des proportions de l'ordre de 1/5 à 1/10). L'incubation se fait à 15°C pendant une nuit.

B.4.4.3. Electrophorèse en gel d'agarose

La séparation des fragments d'ADN linéaire se fait par migration électrophorétique à travers un gel d'agarose (de 0,4 % à 1,2 % suivant la taille des fragments à séparer).

Le tampon de migration utilisé est le TEA [Tris-HCl 1,6 mM ; acétate de sodium 1,6 mM, EDTA 0,04 mM (pH = 8)]. Le dépôt dans les puits du gel se fait en ajoutant à la solution d'ADN, 1/10 de volume de solution de dépôt [bleu de bromophénol 0,25 % (p/v) ; xylène cyanol 0,25 % (p/v) ; EDTA 25 mM ; glycérol 50 % (v/v)]. La migration à lieu de la cathode vers l'anode sous tension constante (80V). L'électrophorèse est suivie grâce aux colorants contenus dans la solution de dépôt.

B.4.4.4. Isolement d'un fragment d'ADN

La purification des fragments de restriction s'avère nécessaire lorsque des expériences de clonage ou d'hybridation sont envisagées. Les différents fragments sont d'abord séparés sur un gel d'agarose de concentration adéquate. Différentes techniques d'isolement de l'ADN peuvent alors être appliquées.

Nous avons principalement utilisé la technique d'électroélution. Les bandes d'ADN sont découpées dans le gel et placées dans un boyau de dialyse (Cellu Sep, Polylabo) contenant du tampon TEA (§ B.4.4.3.). Ce boyau est alors plongé dans la cuve à électrophorèse et soumis à un courant de 80 V pendant 5 à 15 minutes (selon la taille des blocs d'agarose découpés). Le courant est inversé pendant 30 secondes (pour décoller l'ADN de la membrane) et le TEA contenant le fragment à purifier est prélevé à la pipette. L'ADN est précipité en ajoutant 1/10 de volume de solution d'acétate de sodium 3M et 2,5 volumes d'éthanol 100% à - 20°C. Après centrifugation (7 000 g, 15 min, 4°C), le culot d'ADN est rincé dans l'éthanol 70 %, séché rapidement sous vide et repris dans un petit volume d'eau stérile ou de TE [Tris-HCl 10 mM ; EDTA 1 mM]. Cette technique est très simple et montre un bon rendement lorsque les quantités d'ADN à purifier sont importantes (> 1 µg).

Pour des quantités plus faibles, nous avons utilisé le Kit *Gene Clean II* (BioSystems). Après la migration, les fragments à purifier sont découpés dans le gel. La bande d'agarose est dissoute dans trois fois son volume d'une solution d'iodure de sodium (NaI) à 55°C. Cinq microlitres d'une solution de microbilles de silice (glassmilk) sont alors ajoutés. Le mélange est laissé dans la glace pendant cinq minutes au cours desquelles l'ADN va s'adsorber sur les microbilles de silice grâce à la présence d'une forte concentration saline. Le surnageant est éliminé par centrifugation rapide (10 000 g, 10 sec, 4°C), et le culot est rincé (trois fois) par un millilitre d'une solution d'éthanol fortement concentrée en sel (New Wash), permettant l'élimination de l'agarose. L'ADN est alors élué des billes, en 5 minutes, par addition d'eau à 55°C.

B.4.5. Introduction d'ADN plasmidique dans une bactérie

B.4.5.1. Transformation

La transformation permet d'introduire de l'ADN dans une cellule bactérienne hôte dont la paroi a été traitée par des ions calcium qui augmentent sa compétence à la transformation.

Un volume de 150 ml de milieu BL est inoculé avec 1,5 ml d'une préculture de la bactérie à transformer (*Escherichia coli* NM522 dans ce travail). La croissance bactérienne est suivie jusqu'à l'obtention d'une DO_{600} d'environ 0,5 correspondant à 10^8 cellules/ml. La culture est alors placée 15 minutes dans la glace, puis centrifugée (4 000 g, 10 min, 4°C). Le culot est repris délicatement par 50 ml d'une solution C [$CaCl_2$ 50 mM ; Tris-HCl 10 mM (pH = 8)] conservée à 4°C. Les cellules en suspension sont laissées dans la glace pendant 20 minutes puis sont à nouveau centrifugées (4 000 g, 10 min, 4°C). Le culot est finalement repris par 5 millilitres de solution C additionnée de glycérol 15 % (v/v). Les cellules peuvent être utilisées tout de suite, ou aliquotées par 200 µl et conservées à - 80°C.

A 200 µl de cellules compétentes sont ajoutés 0,1 à 1 µg de plasmide ou d'extrait issu d'une ligature. Le mélange est laissé 20 minutes dans la glace, puis soumis à un choc thermique de deux minutes à 42°C. Un volume de 800 µl de milieu BL est alors ajouté et la culture est incubée à 37°C pendant une heure pour permettre l'expression des gènes de résistance aux antibiotiques portés par le plasmide. Cette culture est alors étalée à raison de 200 µl par boîte de milieu sélectif contenant les antibiotiques adéquats. Après 24 à 48 heures d'incubation, les clones transformés apparaissent en colonies sur les boîtes de Pétri.

B.4.5.2. Electroporation

L'électroporation est une technique souvent plus performante que la transformation qui permet l'introduction d'ADN dans une cellule bactérienne hôte par choc électrique. Les cellules sont d'abord lavées pour éliminer toute trace de sels qui pourraient diminuer la résistance électrique du milieu et créer un arc électrique.

Une culture est réalisée dans les même conditions que pour la transformation. Cette culture est refroidie 15 minutes à 4°C. Une série de quatre centrifugations (6 000 g, 10 min, 4°C) permet un lavage des cellules dans 40 ml de glycérol 10 % (v/v). Au dernier lavage, les cellules sont reprises dans 400 µl de glycérol 10 % (v/v) et celles-ci sont alors utilisées immédiatement ou conservées à - 80°C.

Le plasmide transformant pénètre dans la cellule grâce à un choc électrique très bref mais d'une grande intensité (Appareil BioRad, résistance de 400 ohms, capacitance de 25 µFd, voltage de

12 500 volts/cm). L'électroporation s'effectue en soumettant à une décharge électrique 50 µl de cellules compétentes en présence d'environ un nanogramme d'ADN plasmidique. Après l'impulsion électrique, 950 µl de milieu BL sont ajoutés et le tout est incubé une heure à 37°C pour permettre l'expression des gènes de résistance aux antibiotiques portés par le plasmide. Les cultures sont étalées sur milieu sélectif et les colonies transformées apparaissent après 24 à 48 heures d'incubation à 37°C.

B.4.6. Amplification de fragments d'ADN chromosomique par PCR

La technique utilisée (Polymérase Chain Reaction) est basée sur le fonctionnement cyclique d'une ADN polymérase. L'amplification s'effectue sur un fragment d'ADN à partir de deux amorces oligonucléotidiques s'appariant spécifiquement aux extrémités des deux brins complémentaires de la partie de l'ADN à amplifier (matrice).

Dans le cadre de ce travail, l'appareil Gene Amp 2400 (Perkin Elmer) a été utilisé. Le volume réactionnel est de 50 µl, les différentes concentrations des réactifs ainsi que les durées et les températures de chacun des cycles sont décrites sur la figure B.4.1.

A

ADN matrice	10ng
amorce 3’	20 pmol
amorce 5’	20 pmol
dNTP	0,8 mM
Tampon 10X	5 µl
Taq DNA polymérase	0,25 unités
qsp 50 µl d’H_2O	

B

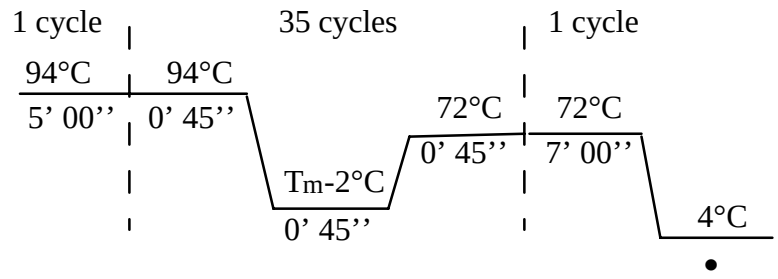


Figure B.4.1 : Protocole d'amplification d'un fragment d'ADN par PCR. A : mélange réactionnel ; B : cycles de la réaction.

B.4.7. Clonage des fragments de PCR

Deux techniques de clonage de fragments de PCR ont été utilisées dans ce travail. La première consiste à utiliser des amorces de PCR particulières possédant des sites de restriction à leurs extrémités 3' (*Xba I* et *Kpn I* par exemple). Après amplification, l'ADN est purifié, coupé par les enzymes correspondantes et inséré dans un vecteur lui même ouvert par ces deux enzymes. Le mélange de ligature est alors utilisé directement pour transformer la souche bactérienne hôte *Escherichia coli* NM522 selon la technique décrite au paragraphe B.4.5.

La deuxième technique utilise le Kit pMos*Blue* T-vector (Amersham). Celle-ci est essentiellement basée sur l'utilisation, d'une part d'un vecteur particulier ouvert en T (c'est-à-dire possédant à ces deux extrémités 5' une base T non appariée), et d'autre part sur la propriété des Taq DNA polymérases consistant à rajouter en fin de séquence (en 3') une base A non appariée. Ainsi, les fragments issus d'une amplification PCR (préférentiellement sans cycle terminal d'élongation de 7 minutes à 72°C), peuvent être directement insérés dans un vecteur pMos*Blue* selon la technique décrite au paragraphe B.4.4.2 et insérés dans une souche hôte par transformation.

Quelle que soit la technique de clonage utilisée, les clones transformants positifs (ceux ayant intégré le fragment à cloner) sont repérés par un test d'α-complémentation. En effet, les vecteurs utilisés dans ce travail (pUC et pMos*Blue*) possèdent un fragment d'ADN d'*Escherichia coli* qui contient les séquences régulatrices et la région codant les 146 premiers acides aminés (portion α de la molécule) du gène *lacZ* codant la ß-galactosidase. A l'intérieur de cette région se trouve un site multiple de clonage ou "polylinker" qui n'altère pas la phase de lecture. Ces vecteurs sont utilisés dans la souche hôte (Lac^-) NM522, qui porte sur un épisome un fragment de gène codant la portion carboxyterminale de la ß-galactosidase. Ni la protéine produite par l'hôte, ni la protéine issue du plasmide ne sont actives seules. Mais l'association non covalente de ces deux fragments peptidiques donne une enzyme active. Il est facile de repérer les bactéries Lac^+, car en présence d'un substrat chromogène [X-galactose 12 µM] et d'un inducteur [isopropylthio-ß-D-galactoside (IPTG) 200 µM], elles forment des colonies bleues. Par contre, l'insertion d'un fragment d'ADN dans le polylinker du plasmide (clones positifs) empêche la synthèse d'un fragment α actif. Les bactéries abritant de tels plasmides sont incapables de couper le X-Galactose et formeront donc des colonies blanches.

B.4.8. Séquençage de l'ADN

Une partie des séquences présentées dans ce travail a été réalisée au laboratoire (clone SymI) et l'autre partie a été réalisée par l'Entreprise Genome Express (Grenoble) utilisant un séquenceur automatique. Seul le protocole utilisé en routine au laboratoire [Kit T^7-sequencing (Pharmacia)] sera brièvement présenté ici.

B.4.8.1. Principe de la méthode

La technique de séquençage utilisée est celle décrite par Sanger *et al.* (1977). Un oligonucléotide amorce, hybridé à une molécule d'ADN simple brin, peut être allongé en présence des quatre désoxyribonucléotides grâce à l'action de la DNA polymérase. Cette enzyme peut également incorporer de façon efficace des didésoxyribonucléotides triphosphates dépourvus de groupe hydroxyle en 3' sur le ribose. Ces didésoxy-ribonucléotides, une fois

incorporés, agissent comme inhibiteurs spécifiques de l'élongation de la chaîne d'ADN nouvellement synthétisée.

Dans un premier temps, l'amorce hybridée à l'ADN matrice est allongée en présence des quatre désoxyribonucléotides dont l'un (ATP) est marqué au soufre radioactif ^{35}S. Le mélange réactionnel est ensuite réparti dans quatre tubes contenant, en plus des quatre désoxyribonucléotides, chacun un des didésoxyribonucléotides triphosphates. Chacune des quatre réactions engendre un mélange de molécules de tailles différentes terminées par le même didésoxyribonucléotide (suivant le tube) et possédant la même extrémité 5'. Les produits des quatre réactions sont ensuite séparés en parallèle par électrophorèse sur un gel de polyacrylamide. L'origine de l'élongation étant la même dans les quatre réactions, la séquence nucléotidique du fragment d'ADN peut être déduite à partir de l'autoradiogramme du gel. Cependant cette technique ne permet pas de lire plus de 300 nucléotides par réaction. Il a donc été nécessaire de faire des délétions successives du fragment à séquencer par sous-clonages.

B.4.8.2. Préparation de l'ADN pour le séquençage

De l'ADN monocaténaire peut être obtenu à partir d'ADN plasmidique par dénaturation en milieu alcalin. Un volume de 10 à 15 µl (1,5 à 2 µg) d'ADN plasmidique non congelé (§ B.4.3) est ajouté à 10 µl de NaOH 1 M (10 minutes, température ambiante). Dix microlitres d'acétate de sodium 3 M (pH = 4,8) et 100 µl d'éthanol 100 % sont alors ajoutés pour précipiter l'ADN dénaturé. Après centrifugation (8 000 g, 10 min, 4°C), le surnageant est éliminé et l'ADN rincé avec 900 µl d'éthanol 75 %. Après une seconde centrifugation (10 000 g, 15 min, 4°C), le culot d'ADN est séché sous vide et repris délicatement dans 10 µl d'eau ultra pure.

B.4.8.3. Réaction de séquençage

L'ADN est hybridé avec une amorce (2 µl d'amorce à 0,8 µM), dans un tampon d'appariement renfermant du dithiothréitol (DTT) et du $MgCl_2$. L'hybridation se fait durant 20 minutes à 37°C. Le tube est centrifugé brièvement, puis la réaction de marquage a lieu à température ambiante durant 5 minutes après addition de 6 µl de solution de marquage contenant l'ADN polymérase, l'$ATPS^{35}$ et les trois autres désoxyribonucléotides. La réaction d'élongation est ensuite effectuée en répartissant 3,5 µl dans quatre tubes contenant chacun 2,5 µl d'un mélange d'un des didésoxyribonucléotides et des trois autres désoxyribonucléotides (80 µM chacun). L'incubation est poursuivie 5 minutes à 37°C, puis les réactions sont arrêtées par l'ajout de 4 µl de solution d’arrêt. Les échantillons sont conservés à - 20°C.

B.4.8.4. Electrophorèse et autoradiographie

Les échantillons sont dénaturés 5 minutes à 95°C et 1,5 µl de chacun d'eux sont déposés sur un gel de polyacrylamide 6 %, contenant 7 M d'urée. Le gel (45 x 35 cm) est coulé verticalement selon un gradient d'épaisseur de 0,2 à 0,7 mm. Le tampon d'électrophorèse est un tampon TBE [Tris-HCl 90 mM ; acide borique 90 mM ; EDTA 2 mM (pH = 8)]. Une prémigration est réalisée à 1 200 V pendant 15 minutes (Appareil EC 160, Polylabo). Les échantillons sont alors déposés et la migration est poursuivie à 1 400 V pendant 1 heure 30 à 3 heures.

Après migration, les échantillons sont fixés sur le gel pendant 20 minutes dans un bain de fixation [acide acétique 10 % (v/v), éthanol 10 % (v/v)] puis le gel est transféré sur une feuille de papier 3MM (Whatman) et séché deux heures dans un sécheur de gels LKB. L'autoradiographie est ensuite réalisée pendant une nuit, ou plus si nécessair, au contact d'un film HyperFilm MP Amersham à - 70°C.

B.4.9. Techniques d'hybridation moléculaire

B.4.9.1. Southern Blot (ADN)

B.4.9.1.1. Extraction de l'ADN chromosomique des endocytobiotes

Des endocytobiotes sont isolés (à partir de 50 à 1 000 larves de quatrième stade) selon le protocole décrit au paragraphe B.2. Le culot bactérien est repris dans 500 µl d'une solution de lyse [Tris-HCl 100 mM (pH = 8) ; NaCl 100 mM ; EDTA 100 mM ; SDS 1 % (p/v), protéinase K 0,1 % (p/v)] et incubé une heure à 42°C. De la RNAse A (100 µg/ml) est ensuite ajoutée et la solution est incubée une heure à 37°C. Un volume de 500 µl d'un mélange phénol/chloroforme/alcool isoamylique [25/24/1 (v/v)] sont ajoutés, et après 30 secondes d'agitation manuelle les tubes sont centrifugés (7 000 g, 5 min, 4°C). La phase aqueuse contenant l'ADN est récoltée. Un volume de 50 µl d'acétate de sodium 3 M (pH = 8) et 1,2 ml d'éthanol 100 % sont ajoutés pour précipiter l'ADN. Une centrifugation (7 000 g, 15 min, 4°C) permet l'obtention d'un culot d'ADN. Celui-ci est rincé à l'éthanol 70 % et conservé à - 20°C ou remis en solution dans du TE [Tris-HCl 10 mM ; EDTA 1mM] pour utilisation.

B.4.9.1.2. Transfert de l'ADN sur membrane de nylon

Après coupure par des enzymes de restriction et migration des fragments sur gel d'agarose, le transfert d'ADN se fait sur une membrane de nylon Hybond N^+ (Amersham). Le gel est placé 30 minutes dans un bain d'HCl 0,25 N, puis dénaturé 30 minutes dans un bain [NaOH 0,4 N ; NaCl 1 M]. Il est enfin rééquilibré 30 minutes dans un dernier bain [Tris-HCl 0,5 M (pH = 7,5) ; NaCl 1,5 M]. Le transfert est réalisé pendant une nuit dans un tampon SSC 20X

[NaCl 3 M ; citrate de sodium 0,3 M] selon le montage décrit ci-dessous (Figure B.4.2). Les membranes sont finalement chauffées deux heures à 80°C pour fixer l'ADN.

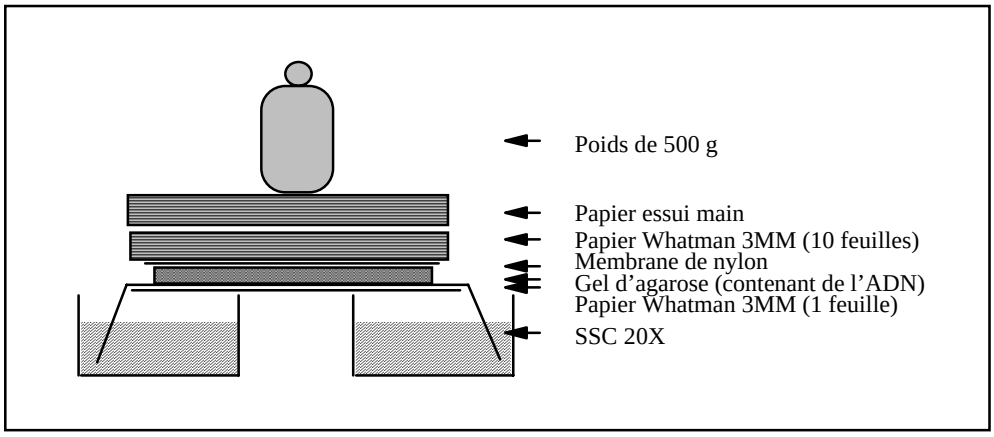


Figure B.4.2 : Transfert de l'ADN sur membrane de nylon par capillarité en milieu salin.

B.4.9.1.3. PREPARATION DES SONDES RADIOACTIVES

Le fragment d'ADN sonde à marquer est isolé selon une des méthodes décrites au paragraphe B.4.4.3. Le marquage se fait par amorçage aléatoire (random priming), avec le kit Nonaprimer (Appligene). La sonde (50 à 100 ng d'ADN) est dénaturée 10 minutes à 95°C, puis refroidie brutalement dans la glace. Un mélange d'hexanucléotides à séquence aléatoire s'hybrident en différentes régions de l'ADN sonde. Ces hexanucléotides sont allongés par une DNA polymérase, en présence des quatre nucléotides dont l'un est radioactif (dCTP α^{32}P). Les nucléotides non incorporés sont éliminés grâce à une résine capable de fixer l'ADN et selon un protocole très proche de celui du Kit "Gene Clean" décrit au paragraphe B.4.4.3.

B.4.9.1.4. HYBRIDATION ET AUTORADIOGRAPHIE

Avant l'hybridation proprement dite, la membrane est saturée avec un ADN non spécifique ne donnant pas d'hybridation avec la sonde : c'est la préhybridation. La membrane est préhybridée à 42°C pendant 12 heures dans un tampon P [NaCl 0,75 M ; Citrate de sodium 75 mM ; Ficoll 1 % (p/v) ; BSA 1 % (p/v) ; polyvinylpyrolidone 1 % (p/v) ; formamide 50 % (v/v) ; SDS 0,2 % ; ADN de sperme de saumon dénaturé (95°C, 15 minutes) 0,4 mg/ml ; ADN de sperme de hareng dénaturé (95°C, 15 minutes) 0,4 mg/ml].

L'hybridation (12 heures, 42°C) se fait dans un tampon P additionné de la sonde, préalablement chauffée à 95°C (3 min) puis refroidie dans la glace. Les membranes sont ensuite lavées avec des solutions de forces ioniques différentes (2X SSC à 0,5X SSC) en fonction des degrés d'homologie de la sonde avec le fragment à marquer. Le rapport bruit de fond sur signal est contrôlé au compteur Geiger et permet de décider de l'arrêt ou de la poursuite du lavage. Pour

une sonde ayant 100 % d'homologie trois lavages successifs (10 min) à 55°C dans du SSC 1X, 1X et 0,5X sont généralement réalisés.

Après avoir été emballée dans un film plastique, la membrane est placée contre un film Hyperfilm MP (Amersham) dans une cassette pour autoradiographie pendant deux heures à une semaine à - 80°C (en fonction de l'intensité du signal).

B.4.9.2. Northern blot (ARN)

Étant donné la fragilité de l'ARN, la grande résistance et l'ubiquité des RNAses, toutes les solutions et la verrerie sont traitées pour éliminer ces enzymes. Pendant les manipulations et la préparation du matériel (stérilisation de la vaisselle et des cônes plastiques), le port des gants, à cause de la présence de RNAses sur la peau, est obligatoire. La vaisselle est traitée à la soude 0,2 M (12 heures) et les solutions sont autoclavées en présence de DEPC (diéthyl pyrocarbonate) 0,1 % (v/v) avant utilisation.

B.4.9.2.1. Extraction de l'ARN des larves de charançons et des endocytobiotes

La méthode utilisée est la méthode du TRIzol™ (Life Technologies). Elle est basée sur une solution prête à l'emploi permettant l'extraction rapide d'une quantité faible ou importante d'ARN. Les tissus vivants (larves ou culot d'endocytobiotes) sont congelés dans l'azote liquide puis broyés, à température ambiante, au potter dans la solution TRIzol™ (1 ml pour 50 à 100 mg de tissu ou 10^7 cellules bactériennes). Après 5 minutes d'incubation, 200 µl de chloroforme sont ajoutés et les tubes sont agités vigoureusement à la main pendant 15 secondes. Après 3 minutes d'incubation, ils sont centrifugés (12 000 g, 15 min, 4°C). La phase aqueuse est reprise dans des tubes propres et 500 µl d'alcool isopropylique sont ajoutés pour précipiter les ARN. Après 10 minutes d'incubation, les ARN sont culottés par centrifugation (12 000 g, 15 min, 4°C). Le culot est ensuite rincé par un millilitre d'éthanol 75 % puis séché très rapidement sous vide. Les ARN sont ensuite repris dans un petit volume d'eau en chauffant à 55°C pendant environ 15 minutes. La concentration en ARN est alors mesurée au spectrophotomètre UV (260 nm, ε = 40 µg/ml/cm) et les échantillons sont stockés à - 70°C.

B.4.9.2.2. Électrophorese en condition denaturante

La méthode que nous avons employée utilise la dénaturation des ARN par le glyoxal et le diméthylsulfoxide (DMSO). Entre 5 et 30 µg d'ARN sont repris dans 25 µl de solution de dénaturation D [glyoxal désionisé 1 M ; DMSO 50 % (v/v) ; NaH_2PO4 (pH = 7) 10 mM] et chauffés 50 minutes à 55°C. Un volume de 4 µl de solution de dépôt [glycérol 50 % (v/v) ; NaH_2PO4 (pH = 7) 10 mM ; bleu de bromophénol 0,25 % (p/v) ; xylène cyanol 0,25 % (p/v)] est ajouté avant le dépôt des échantillons sur le gel [agarose 1,2 % dans NaH_2PO4 10 mM (pH = 7)]. Le tampon est recyclé automatiquement de l'anode vers la cathode au moyen d'une pompe péristaltique pendant la migration.

B.4.9.2.3. TRANSFERT ET HYBRIDATION

Après électrophorèse, le gel est directement transféré (sans pré-traitement), selon le protocole décrit au paragraphe B.4.9.1.2, sur des membranes de nylon Hybond N^+ (Amersham). Elles sont ensuite chauffées à 80°C (2 heures) pour fixer l'ARN. La préparation de la sonde ainsi que l'hybridation, le lavage et l'autoradiographie sont réalisés comme décrit dans les paragraphes B.4.9.1.3 et B.4.9.1.4.

B.5. ELECTROPHORESE EN CHAMPS PULSES

Cette technique d'électrophorèse en gel d'agarose permet de séparer de longs fragments d'ADN génomique pour réaliser une carte de restriction de chromosomes bactériens par exemple. Le principe consiste à faire migrer l'ADN suivant deux champs électriques alternatifs et ayant des directions formant un angle de 120°C (Electrophorèse en champs croisés). Selon ce procédé, pour avancer dans le gel, les molécules devront tout d'abord pivoter dans le sens du champ. Ces réorientations étant d'autant plus lentes que les fragments sont grands, il est ainsi possible de séparer des fragments de 50 kb à plusieurs mégabases (Schwartz et Cantor, 1984).

B.5.1. Préparation des échantillons

Les endocytobiotes sont préparés selon la procédure décrite au chapitre B.2. Ils sont ensuite repris dans un tampon Y [NaCl 200 mM ; KCl 20 mM ; $CaCl_2$ 6,6 mM ; $NaHCO_3$ 2,4 mM ; NaH_2PO_4 0,1 mM ; glucose 5,5 mM ; lévulose 2,2 mM ; maltose 42 mM (pH = 6,8)] à la concentration de 4.10^9 cellules par ml. La concentration en endocytobiotes est estimée par comptage en cellule de Thoma. Des petits blocs d'agarose ultra purs (Insert^{TM}, FMC) sont préparés selon le protocole décrit par Smith *et al.* (1988) en mélangeant 500 µl de la solution d'endocytobiotes à 600 µl d'agarose fondu (1 % p/v). Après solidification les blocs sont immergés dans une solution de lyse [glucose 100 mM ; Tris-HCl (pH = 8,0) 25 mM ; EDTA 10 mM, lysozyme 2 mg/ml] et incubés sous agitation douce 30 minutes à 37°C.

La solution de lyse est ensuite remplacée par une autre solution [glucose 100 mM ; Tris-HCl 25 mM (pH = 8,0) ; EDTA 10mM ; protéinase K 1mg/ml] et l'incubation est prolongée toute la nuit à 50°C. Les blocs sont alors rincés (1 heure au noir) dans une solution de TE [Tris-HCl 10 mM (pH = 7,5) ; EDTA 1 mM] contenant un millimolaire de phénylméthylsulfonyl fluoride (PMSF). Les blocs sont finalement lavés 3 fois 30 minutes dans au moins dix volumes de TE avant d'être stockés (dans le TE) à 4°C.

B.5.2. Digestion enzymatique

Des portions de blocs d'environ 50 µl sont découpés et incubés en présence de 100 µg/ml d'albumine bovine (BSA), 15 µl de tampon de digestion et 80 µl d'eau stérile. Vingt unités enzymatiques par blocs ont été utilisées pour les enzymes *Xba I* et *Spe I* (incubation 5 heures à 37°C) et *Swa I* (incubation 5 heures à température ambiante). Deux unités enzymatiques par blocs sont nécessaires pour la digestion avec l'endonucléase *I-Ceu I* (incubation trois heures à 37°C).

B.5.3. Electrophorèse et coloration des gels

Les fragments d'ADN sont séparés dans un gel d'agarose à 1 % avec comme tampon d'électrophorèse un tampon TBE modifié [Tris-HCl 0,1 M ; acide borique 0,1 M ; EDTA 0,2 mM]. L'électrophorèse (appareil Pulsaphor, Pharmacia) est conduite à 10 V/cm d'agarose pendant 12 heures à 3 jours avec une période d'alternance de champ ("pulse") variant de 10 secondes à 40 minutes en fonction de la taille des fragments à analyser. Un marqueur de taille constitué par des concatémaires de phage λ (de taille multiple de 48,5 kb) est déposé à côté des échantillons.

Après électrophorèse, l'ADN est révélé par coloration du gel 10 minutes dans une solution de bromure d'éthidium (BET) à 0,5 mg/ml puis rincé 20 minutes dans de l'eau. La solution de BET est ensuite filtrée sur du charbon actif, pour piéger et éliminer le BET.

B.6. ANALYSE DES SEQUENCES D'ADN ET DES SEQUENCES PROTEIQUES

B.6.1. Recherche des séquences

Les différentes séquences qui ont été utilisées dans ce travail (*rrs*, *hsp60* et *hsp10*) proviennent des différentes bases de données accessibles sur Internet, GenBank[1] (Benson *et al.*, 1993) et SSU rRNA data base[2] (Van de Peer *et al.*, 1994) pour les séquences nucléiques, Swiss prot data base[3] (Bairoch et Boeckmann, 1994) pour les séquences d'acides aminés. Le système

[1]http://www.ncbi.nlm.nih.gov/

[2]http://rrna.uia.ac.be/rrna/ssuform.htlm

[3]http://expasy.hcuge.ch/sprot/sprot-top.htlm

d'interrogation ACNUC[4] (Gouy *et al.*, 1985) de l'Université Claude Bernard de Lyon a également été utilisé. Les recherches de séquences par mots clefs ont été faites grâce au réseau Internet en utilisant le logiciel ENTREZ (National Center for Biotechnology Information, Etats-Unis) pour l'interrogation de GenBank par exemple.

B.6.2. Alignement et phylogénie

Les alignements et les arbres phylogénétiques ont été réalisés avec le logiciel Clustalw-big'n'FAT (Macintosh). La matrice de substitution BLOSUM30 a été utilisée pour les alignements de séquences d'acides aminés. Tous les résultats d'alignement ont été vérifiés visuellement grâce au logiciel de gestion de séquences SeqPup/PPC (Macintosh). Les arbres phylogénétiques ont été calculés avec la méthode du "Neighbour joining" (Saitou et Nei, 1987) en éliminant systématiquement les positions "Gaps" des analyses. Enfin, la technique du "Bootstrap" a été utilisée pour estimer la probabilité de l'existence des différents noeuds de chacun des arbres phylogénétiques.

[4]http://acnuc.univ-lyon1.fr/start.htlm

PARTIE C

RESULTATS ET DISCUSSION

C.1. ASPECTS MOLECULAIRES DES ENDO-CYTOBIOTES DE *SITOPHILUS ORYZAE*

C.1.1. Origine phylogénétique des endocytobiotes de *Sitophilus oryzae*

Au cours de ce travail, la partie codante de deux gènes des endocytobiotes de *Sitophilus oryzae* a été séquencée (§ C.2.2.3). Ces gènes, codant les protéines Hsp60 (548 acides aminés) et Hsp10 (97 acides aminés), sont fortement conservés chez toutes les eubactéries et les organites intracellulaires (Gupta, 1995). Viale et Arakaki (1994) considèrent que ces gènes sont de bons chronomètres moléculaires, peut-être plus performants que l'ADN ribosomal 16S (gène *rrs*). Ces auteurs ont effectivement montré que les contraintes fonctionnelles sur ces protéines chaperons sont plus fortes que sur la majorité des autres protéines utilisées en phylogénie, si bien que l'influence du taux de C+G de l'organisme sur la fréquence de leurs acides aminés est minimisée.

Les arbres phylogénétiques construits d'après les alignements des séquences protéiques d'Hsp60 et d'Hsp10 ont donc été réalisés. Ces derniers se sont révélés très similaires et seul l'arbre des protéines Hsp60, basé sur un plus grand nombre de sites, est présenté (Figure C1.1). L'enracinement a été réalisé en utilisant la protéine Tcp1 de l'archébactérie *Pyrococcus sp.* L'arbre obtenu est cohérent avec l'arbre phylogénétique basé sur les séquences des gènes *rrs* (Woese et Fox, 1977) puisqu'il permet la distinction des grands groupes bactériens (bactéries Gram positives, *Chlamydia*, Spirochètes et classes α, ß, γ, δ et ε des Protéobactéries). De cette analyse, il ressort que l'endocytobiote de *Sitophilus oryzae* appartient au groupe des γ-protéobactéries. Les bactéries les plus proches sont *Escherichia coli* et *Salmonella typhi* ayant respectivement 91,8 % et 91,2 % d'homologie en acides aminés. Ces résultats concordent avec la description histologique présentée dans le paragraphe A.2.

Afin de déterminer plus précisément la position de cette bactérie au sein des γ-protéobactéries, la séquence du gène codant l'ARNr 16S a été utilisée. Cette séquence a été déterminée au laboratoire (Heddi, communication personnelle). Ce gène est très fortement conservé et n'est pas spécialement adapté pour déterminer des branchements fins de la classification (on considère un taux de substitution d'environ 1 % par 50 millions d'année [Ochman et Wilson, 1987 cité par Rousset *et al.*, 1992b]), mais il possède l'avantage d'être connu chez un grand nombre d'espèces et notamment chez beaucoup de bactéries non cultivables (endocytobiotes et parasites).

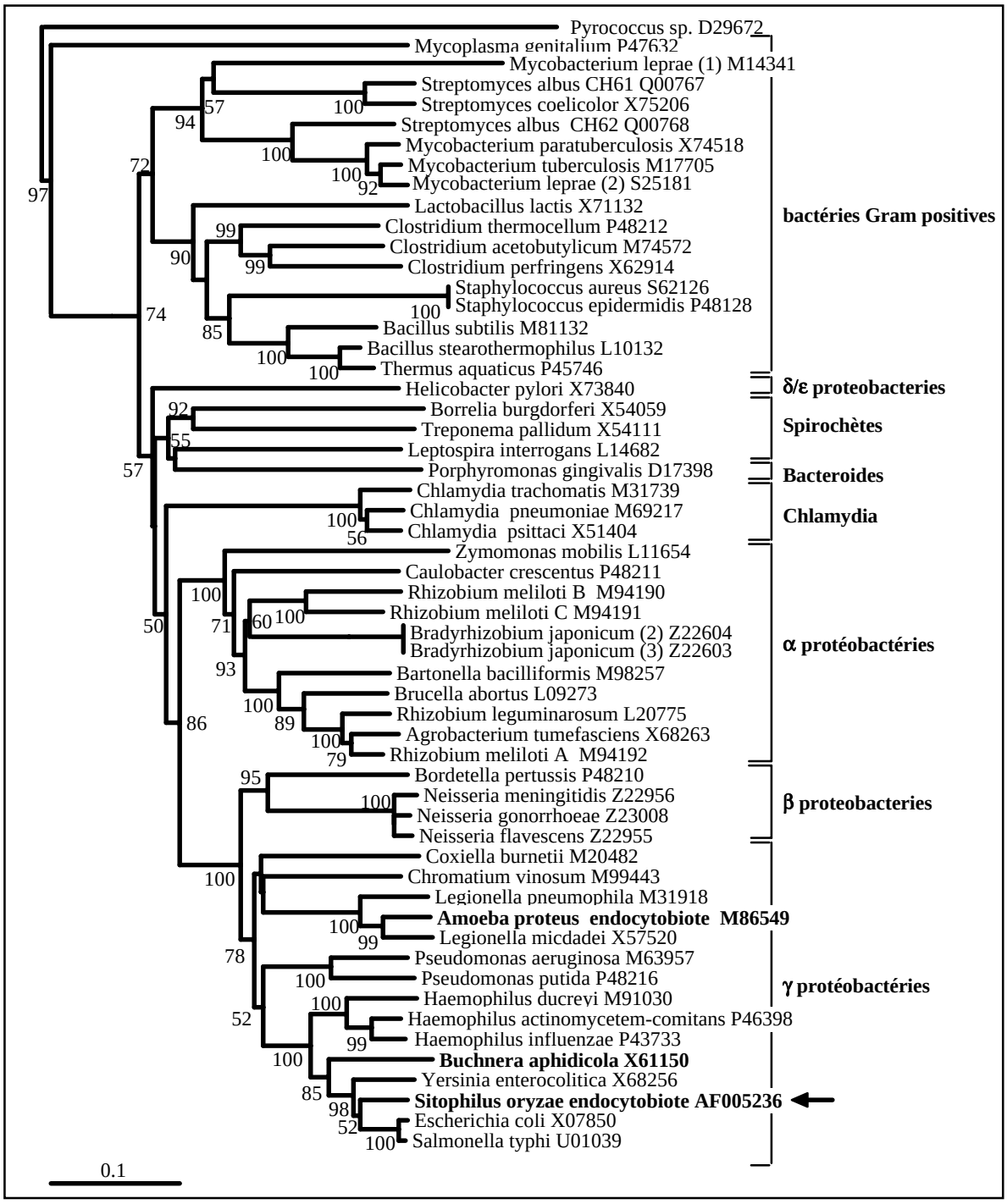


Figure C1.1. : Arbre phylogénétique des Eubactéries, basé sur l'alignement des séquences d'acides aminés de la protéine Hsp60. Les endocytobiotes présents sur cet arbre sont imprimés en caractères gras. Les probabilités d'existence des noeuds (calculées par bootstrap) inférieures à 50 % n'ont pas été reportées ; Les numéros d'accession dans la base de données GenBank sont reportés en face de chaque bactérie.

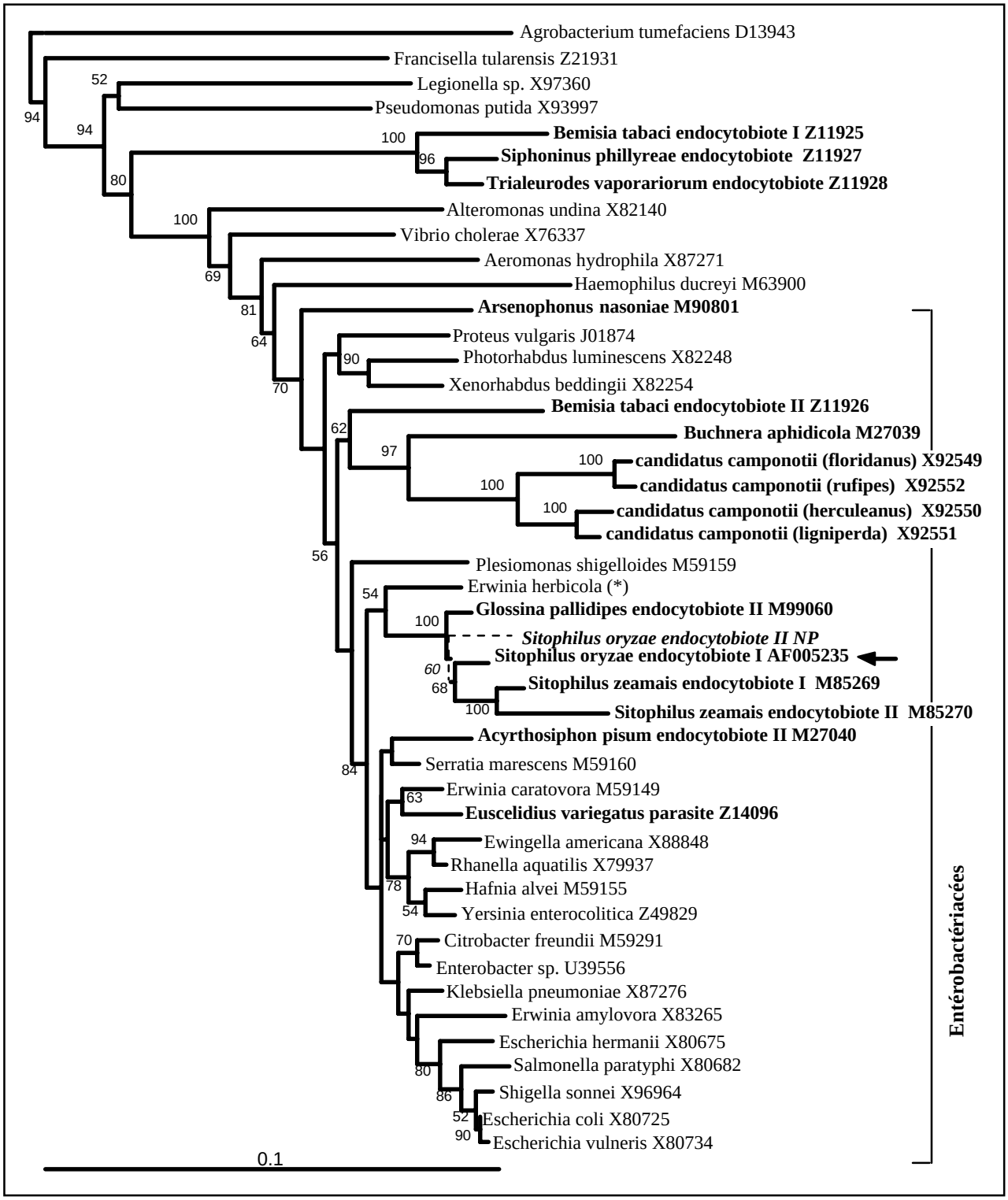


Figure C.1.2 . : Arbre phylogénétique des γ-protéobactéries, basé sur le gène codant l'ARNr 16S. Les différents endocytobiotes (I : primaire, II : secondaire) présents sur cet arbre sont imprimés en caractères gras. Les probabilités d'existence des noeuds (calculées par bootstrap) inférieures à 50 % n'ont pas été reportées ; les numéros d'accession dans la base de données GenBank sont reportés en face de chaque bactérie; (*) : séquence issue de la base de données "RDB data base" (Maidak *et al*., 1994). NP : séquence non publiée.

Les séquences des ARNr 16S de 27 γ-protéobactéries libres et 18 endocytobiotes d'insectes ont été extraites de la base GenBank, puis alignées. L'arbre phylogénétique, obtenu en utilisant *Agrobacterium tumefaciens* (α-protéobactérie) pour l'enracinement, montre l'appartenance des endocytobiotes de *Sitophilus oryzae* à la famille des Enterobacteriaceae (Figure C.1.2.). Les bactéries les plus proches sont les endocytobiotes primaires et secondaires de *Sitophilus zeamais* (espèce jumelle de *Sitophilus oryzae*) et les endocytobiotes de *Glossina pallidipes* (la mouche Tsé-Tsé). La position des endocytobiotes secondaires présumés de *Sitophilus oryzae* est représentée en pointillés sur la Figure C.1.2.

C.1.2. Détermination de la taille du génome des endocytobiotes de *Sitophilus oryzae*

Diverses techniques ont été développées pour estimer la taille des génomes des procaryotes : la colorimétrie, la cinétique de réassociation de l'ADN, l'électrophorèse bidimensionnelle des fragments d'ADN et l'électrophorèse en champs pulsés (PFGE). La technique la plus couramment utilisée jusqu'à ces dernières années était la cinétique de réassociation. Herdman, en 1985, recense ainsi la taille des génomes de plus de 600 souches bactériennes. Toutefois, cette technique, basée sur une mesure indirecte de la taille des génomes, s'est révélée assez peu fiable car dépendante de nombreux autres facteurs (notamment du taux de C+G de l'ADN à mesurer). Les progrès récents de l'électrophorèse en champs pulsés ont permis d'estimer avec une bien meilleure précision la taille du génome de nombreuses bactéries.

C.1.2.1. Électrophorèse en champs pulsés : analyse de restriction

Une analyse préliminaire a été réalisée pour déterminer quelles enzymes devaient être utilisées pour couper l'ADN des endocytobiotes de *Sitophilus oryzae*. Parmi les enzymes testées reconnaissant les séquences riches en C+G (*Not I* et *Sfi I*) ou les séquences riches en A+T (*Dra I* et *Swa I*), seule *Swa I* coupe le chromosome bactérien en un nombre relativement faible de fragments. Des enzymes contenant la séquence CTAG dans leur site de reconnaissance (*Nhe I*, *Xba I* et *Spe I*) ont également été testées. Cette séquence correspond au plus rare tétranucléotide trouvé chez les bactéries à fort taux de C+G. Les enzymes *Xba I* et *Spe I* ont effectivement donné un nombre de fragments compatible avec l'analyse en champs pulsés (données non présentées). Ainsi, les trois enzymes de restriction *Swa I*, *Xba I* et *Spe I* ont été retenues pour effectuer la mesure de la taille du chromosome des endocytobiotes de *Sitophilus oryzae*.

La taille des fragments chromosomiques observés avec ces trois enzymes varie entre 15 et 460 kb. A titre d'exemple, les fragments de digestion obtenus avec *Xba I* sont présentés sur la Figure C.1.3.(A).

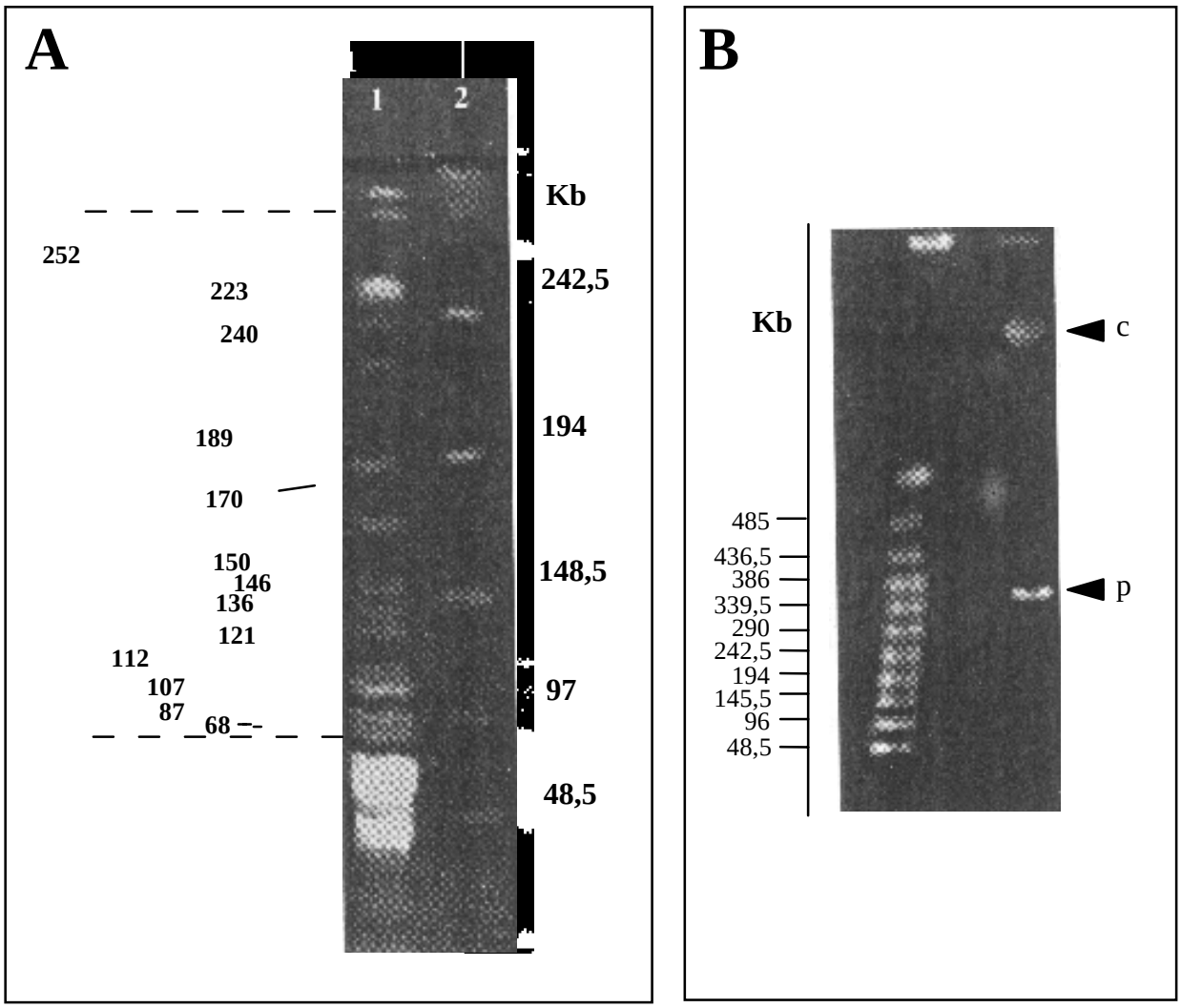


Figure C.1.3. : Détermination de la taille du génome des endocytobiotes de *Sitophilus oryzae*.
(A) : fragments de restriction obtenus après digestion de l'ADN génomique des endocytobiotes de *Sitophilus oryzae* par l'enzyme *Xba I* (puits n°1). Les profils des pics sont obtenus par analyse des gels avec le logiciel NIH-image. Les tailles sont ensuite estimées par régression linéaire grâce à une échelle de poids moléculaire faite de concatémères de phage λ (puit n°2) ; (B) : ADN des endocytobiotes de *Sitophilus oryzae* non digéré ; (p) ADN extrachromosomal (plasmide) ; (c) chromosome bactérien.

La séparation des fragments entre 15 et 50 kb a été réalisée par électrophorèse classique sur gel d'agarose en utilisant un kit de marqueurs de poids moléculaire approprié (Boehringer). Les trois enzymes *Spe I, Swa I* et *Xba I* donnent respectivement 22, 23 et 24 fragments d'ADN. Le Tableau C.1.1. présente les tailles de ces différents fragments. Quand l'ADN bactérien non digéré est soumis à l'électrophorèse, un fragment extrachromosomal est observé (Figure C.1.3.[B]). Le poids moléculaire apparent de ce fragment est variable avec la période ("pulse") du champ électrique, ce qui laisse supposer qu'il s'agit d'un plasmide circulaire (Smith et Condemine, 1990). Cette bande plasmidique est présente parmi les fragments de digestion *Swa I*, mais pas parmi les fragments *Xba I* et *Spe I*, indiquant que ces deux dernières enzymes coupent le plasmide en un site au minimum (Tableau C.1.1.).

Tableau C.1.1 : Taille en kb des différents fragments de restriction obtenus après digestion de l'ADN génomique des endocytobiotes de *Sitophilus oryzae* par les enzymes *Swa I*, *Xba I* et *Spe I* ; (a) : Plasmide non digéré ; (b) : Plasmide linéarisé.

***Swa* I**	***Xba* I**	***Spe I***	***Swa* I**	***Xba* I**	***Spe I***
		509		130	
461				126	
364 **(a)**					121
		340	112		112
291			107	106	107
	281			106	
267			87	87	87
	257		82		
		252	78		
	242			73	
		240		72	
	232			71	
223		223	68		68
	209				63
199	199		58	58	58
	194		53	53	53
		189		50	
184	184		48	48	49
175				44	
		170			40
160			38		
		150		30	30
146		146			25
138	138 **(b)**		17		
		136	15		
	131		3 006 kb	2 985 kb	3167 kb
			Sans plasmide**(a)**	Sans plasmide**(b)**	avec plasmide

La taille du plasmide linéarisé a été déduite de l'analyse des fragments de restriction présentés dans le Tableau C.1.1. La taille du génome de la bactérie symbiotique déterminée par *Swa I* est de 3.0 Mb sans tenir compte de la bande plasmidique. Les masses totales des fragments de restriction calculées pour *Xba I* et *Spe I* sont respectivement 3,123 et 3,167 Mb. Ces résultats indiquent une taille d'environ 150 kb pour le plasmide.

Pour confirmer ces résultats, une sonde radioactive, marquée au ^{32}P, a été réalisée à partir de la bande plasmidique observée Figure C.1.3.(B). Cette sonde a ensuite été hybridée avec les fragments de digestion *Xba I,* et une bande spécifique d'environ 140 kb a été observée (Tableau C.1.1).

C.1.2.2. Digestion de l'ADN des endocytobiotes par *I-ceu I*

L'endonucléase *I-ceu I,* purifiée à partir de *Chlamydomonas eugametos*, est une enzyme de restriction qui reconnaît un site de 26 bp (en acceptant un certain nombre de dégénérescences) spécifique de l'ADN ribosomal 23S (gène *rrl*) de nombreuses bactéries. Ainsi, Liu *et al.* (1993a) ont montré que cette enzyme coupe l'ADN de la plupart des γ-protéobactéries (*Escherichia coli*, *Salmonella*, *Vibrio*, *Haemophillus*) en un nombre de fragments égal au

nombre de copies de l'opéron codant l'ARNr 23S. La Figure C.1.4 montre que *Escherichia coli* possède sept copies de gène *rrl* dans son génome alors que la bactérie symbiotique semble n'en posséder que deux .

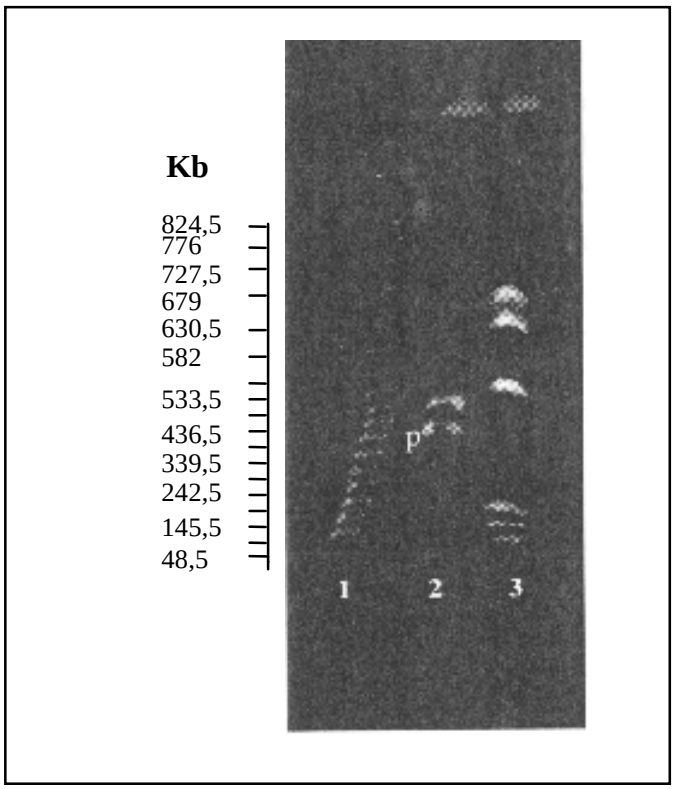


Figure C.1.4 : Digestion par l'enzyme *I-Ceu I*. (1) Echelle de poids moléculaire ; (2) ADN d'*Escherichia coli* ; (3) ADN des endocytobiotes de *Sitophilus oryzae* ; (p) bande plasmidique.

C.1.3. Mesure du taux de C+G de l'ADN des endocytobiotes de *Sitophilus oryzae*

Une première estimation (55 %) du taux de C+G de l'ADN des endocytobiotes de *Sitophilus oryzae* a été réalisée par Dasch *et al.* (1984). Cette valeur étonnamment élevée par rapport à celles des autres bactéries intracellulaires obligatoires (*cf.* Tableau A.3.2.) peut néanmoins être mise en doute. En effet, les auteurs n'ont pas purifié les endocytobiotes pour faire leur mesure par densitométrie. Plusieurs bandes d'ADN ont donc été obtenues et l'attribution de celle de l'ADN des endocytobiotes reste relativement discutable dans la mesure ou ni l'ADN mitochondrial, ni l'ADN des endocytobiotes secondaires (*Wolbachia*) n'ont été repérés. Ils nous a alors semblé nécessaire de vérifier cette mesure par une autre technique et à partir d'endocytobiotes purifiés.

Dans cette perspective, une méthode de dosage des taux de C+G par HPLC a été mise au point (§ B.1.3.). Cette technique a nécessité une étape de calibration et pour cela, des bases du

commerce (A, T, G et C) ont tout d'abord été utilisées. Cependant, comme l'a mentionné Gehrke *et al.* (1984), la difficulté de solubiliser et de peser ces produits en très petites quantités génère une variabilité nettement supérieure à la variabilité de la mesure seule. Il est à noter que les valeurs de la littérature des coefficients d'absorption (ε) de chacune des bases ne peuvent pas non plus être utilisées pour la calibration dans cette étude. En effet, ces coefficients varient en fonction de nombreux paramètres, et notamment en fonction du solvant utilisé ; les bases étant éluées dans un gradient de solvant méthanol/H_20, les coefficients ε sont donc fonction des différents temps de rétention plus ou moins variables pour chaque pic. Dans ces conditions, la calibration directe n'est pas possible. Nous avons donc utilisé une calibration interne en utilisant comme référence l'ADN de sperme de saumon de composition connue (44 %). La méthode de calibration interne possède l'inconvénient d'interdire toute mesure en valeur absolue, mais possède l'avantage d'écraser tous les biais éventuels liés à la préparation des échantillons. Dans cette technique, l'ADN à analyser est purifié puis hydrolysé. Les bases sont séparées par HPLC et les pics sont intégrés automatiquement par l'appareil. Un exemple de chromatogramme est présenté sur la Figure C.1.5.

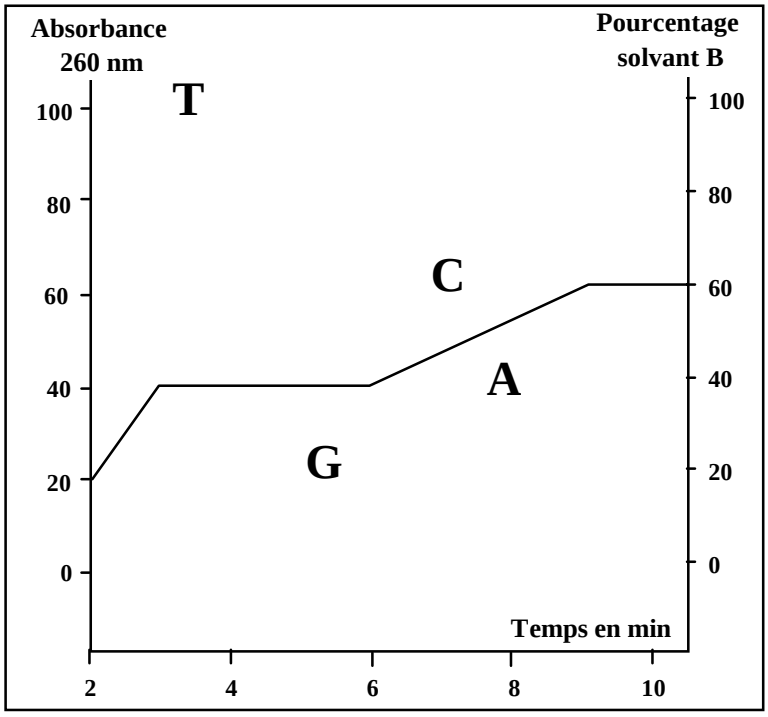


Figure C.1.5. : Profil d'élution des bases de l'ADN par HPLC dans un gradient méthanol/H_2O ; T : thymine ; G : guanine ; C : cytosine ; A : adénine.

L'ADN de référence permet de déterminer pour chacun des quatre pics des pseudo-coefficients ε relatifs qui sont utilisés pour déterminer les taux de C+G des ADN inconnus. Afin de valider cette technique, les compositions en C+G de l'ADN de trois souches bactériennes ont été déterminées. Les résultats sont présentés dans le Tableau C.1.2.

Tableau C.1.2 : Détermination par HPLC du taux global de C+G de l'ADN de quatre espèces bactériennes ; (*) : Bernardi et Bernardi, 1991) ; (**) : Krieg et Holt, 1989 ; les résultats sont présentés sous la forme suivante : moyenne ± déviation standard (n = nombre de répétitions).

Organisme	valeur théorique % C+G	valeur observée % C+G
ADN de sperme de saumon (*)	44	-
Pseudomonas fluorescens (**)	60-62	60 ± 3 (n=4)
Escherichia coli (**)	50-52	53 ± 1 (n=3)
Bacillus subtilis (**)	42-44	44 (n=1)
Endocytobiotes de *Sitophilus oryzae*	-	54 ± 2 (n=5)

Une valeur de 54 % a été trouvée pour l'ADN des endocytobiotes de *Sitophilus oryzae*, ce qui confirme les résultats de Dasch *et al*. (1984). Le taux de C+G des endocytobiotes de *Sitophilus oryzae* a été également estimé en position III (CGIII) du gène codant la protéine Hsp60 et au niveau du gène codant l'ARNr 16S. Des valeurs de 62 % et 54,3 % ont été trouvées respectivement pour ces deux gènes. Ces résultats seront discutés dans le paragraphe suivant.

C.1.4. Discussion

L'analyse phylogénétique réalisée à partir des séquences des gènes *rrs* des γ-protéobactéries (Figure C.1.2) permet d'aborder certains problèmes relatifs à l'évolution très particulière des populations d'endocytobiotes d'insectes.

Tout d'abord il apparaît que les endocytobiotes forment des groupes monophylétiques correspondant pour la plupart à un même type d'hôte. Cette observation laisse supposer que les invasions ancestrales ont eu lieu, le plus souvent, avant la différentiation des espèces d'hôtes. Cette hypothèse a notamment été vérifiée chez le puceron grâce à un arbre phylogénétique daté des différentes souches hôtes mis en parallèle avec l'arbre des endocytobiotes (Moran et Bauman, 1994). L'âge de la symbiose a ainsi été estimée à 200-250 millions d'années chez ces insectes. Ce genre d'analyse ne peut malheureusement pas être réalisé pour le moment chez le genre *Sitophilus* puisque les données concernant à la fois les endocytobiotes et les espèces d'hôtes, ne sont pas disponibles.

Le deuxième aspect remarquable de cette étude concerne les endocytobiotes du puceron, dont un seul représentant (*Buchnera aphidicola*) est positionné sur la Figure C.1.2., et ceux de la fourmi *Camponotus*. En effet, ces deux types de symbiotes forment un seul groupe monophylétique. Un transfert horizontal d'endocytobiotes, favorisé par les relations symbiotiques qui existent entre ces deux types d'insectes, pourrait apporter une explication à cette observation. La même remarque peut être faite à propos des endocytobiotes de *Sitophilus oryzae* et ceux de *Glossina pallidipes*. Cependant, aucune raison biologique ne permet

d'expliquer un éventuel transfert horizontal entre ces deux espèces, il est donc possible que les deux insectes aient été contaminés indépendamment par des bactéries identiques.

Il faut souligner ensuite que chez de nombreux insectes deux types d'endocytobiotes coexistent. Généralement les endocytobiotes les plus intégrés (les plus anciens) sont dits primaires et les autres sont dits secondaires. Chez les aleurodes et les pucerons, les endocytobiotes secondaires sont relativement distants des endocytobiotes primaires et correspondent effectivement à une deuxième infection de l'hôte plus récente que la première (Moran et Bauman, 1994). Par contre, les endocytobiotes primaires et secondaires de l'espèce *Sitophilus zeamaïs*, bien que morphologiquement très différents (forme droite et forme spiralée), sont très proches phylogénétiquement. Ainsi, rien ne permet d'affirmer qu'une forme est plus ancienne que l'autre chez cette espèce. Chez *Sitophilus oryzae*, le même schéma est observé ; la position des endocytobiotes secondaires "présumés" (§ A.2.2.) a été repérée en pointillés sur l'arbre de la Figure C.1.2.

Enfin, le dernier aspect que nous souhaitons développer sur cette étude concerne la bactérie libre la plus proche du groupe des endocytobiotes de *Sitophilus* : *Erwinia herbicola*. Cette bactérie fait partie de la microflore associée au grain de blé et a été décrite comme la seule bactérie de la flore intestinale de *Sitophilus oryzae* (Gasnier-Fauchet, 1985). Elle est de plus majoritairement trouvée dans les fécès des trois espèces de *Sitophilus* : *Sitophilus oryzae*, *Sitophilus zeamais* et *Sitophilus granarius* (Grenier, communication personnelle). Il est donc très tentant de supposer qu'elle pourrait représenter le descendant le plus direct de la forme ancestrale libre des endocytobiotes (homologie de 94,6 %). Chez le puceron du pois *Acyrthosiphon pisum*, c'est également un ancêtre proche de *Erwinia herbicola* qui pourrait être à l'origine des endocytobiotes (Harada *et al.*, 1996). Sous cette hypothèse, et en se basant sur un taux de substitution de 1% par 50 millions d'années pour le gène codant l'ARNr 16S (Ochman et Wilson (1987) cités dans Rousset *et al.*, 1992b), l'âge de la divergence entre *Erwinia herbicola* et les endocytobiotes de *Sitophilus oryzae* peut être estimée à 270 millions d'années. Cette estimation suppose une vitesse d'évolution de la molécule d'ADN ribosomal 16S des endocytobiotes à la fois constante et comparable à la vitesse d'évolution observée chez les bactéries libres. Afin d'encadrer la date de l'association symbiotique, la divergence entre les endocytobiotes primaires des deux espèces jumelles *Sitophilus oryzae* et *Sitophilus zeamais* a été estimée à 97,6 % ce qui correspond à environ 120 millions d'années. Il est à noter que la divergence entre les séquences d'ARNr 16S des endocytobiotes de *Glossina pallidipes* et de *Sitophilus oryzae* est du même ordre de grandeur (97,9 %). L'age de la symbiose chez *Sitophilus oryzae* semble donc comprise entre 120 et 270 millions d'années, nous verrons dans le dernier chapitre que la confrontation de ces données moléculaires avec les données paléontologiques permet d'affiner grandement cette estimation.

La taille du génome et le taux de C+G des endocytobiotes de *Sitophilus oryzae* ont été déterminés dans ce travail. Afin de mettre en évidence les principales caractéristiques de

l'évolution de ces bactéries symbiotiques, nous les avons comparées sur la base de ces deux critères aux autres bactéries libres de la famille des Enterobacteriaceae. Cette famille se caractérise en effet par une certaine homogénéité de taille des génomes et de taux de C+G (Tableau C.1.3.).

Tableau C.1.3 : Taux de C+G et taille des génomes des bactéries de la famille des entérobactériacées. Les taux de C+G (intervalle de variation du genre) sont extraits du "Bergeys' Manual of determinative bacteriology " (Krieg et Holt, 1989). Les tailles des génomes ont été estimées soit par électrophorèse en champs pulsés (PFGE), soit par cinétique de réassociation (CR).

Bactéries	Taux de C+G	Taille du génome	Références
Citrobacter freundii	50-52	4.9 Mb$^{(CR)}$	(Herdman, 1985)
Enterobacter sp.	52-59	4.0 Mb$^{(CR)}$	(Herdman, 1985)
Erwinia crysanthemis	53-58	3.7 Mb$^{(PFGE)}$	Condemine, communication personnelle
Erwinia herbicola	53-58	4.69 Mb$^{(CR)}$	(Herdman, 1985)
Escherichia coli	50-52	4.7 Mb$^{(PFGE)}$	(Krawiec et Riley, 1990)
Klebsiella	53-58	4.06 Mb$^{(CR)}$	(Herdman, 1985)
Proteus vulgaris	38-41	3.21 Mb$^{(CR)}$	(Herdman, 1985)
Salmonella	50-53	4.95 Mb$^{(PFGE)}$	(Liu *et al.*, 1993b)
Serratia marcescens	52-60	6.12 Mb$^{(CR)}$	(Herdman, 1985)
Shigella sonnei	49-53	3.84 Mb$^{(CR)}$	(Herdman, 1985)
Yersinia pestis	46-50	4.4 Mb$^{(PFGE)}$	(Lucier et Brubaker, 1992)
Sitophilus oryzae	54	3,0 Mb$^{(PFGE)}$	Ce travail

La taille du génome des endocytobiotes de *Sitophilus oryzae*, estimée dans ce travail à 3,0 Mb, correspond à 63 % de la taille du génome d'*Erwinia herbicola*. Cette diminution d'environ 36 % du génome ancestral peut s'interpréter par la délétion d'un certain nombre de gènes devenus inutiles dans le nouvel environnement protégé de la bactérie. L'avantage sélectif de cette diminution peut s'interpréter par une plus grande efficacité de la réplication (un moindre coût énergétique et un moindre risque d'erreurs). La contre-partie serait sans doute la perte d'autonomie de la bactérie et peut-être également la diminution de sa vitesse de croissance (à cause de l'apparition de carences métaboliques par exemple). Nardon (1978) a montré que durant le développement larvaire (environ un mois) les endocytobiotes subissent seulement sept cycles de division (en supposant une mortalité nulle). Cette vie "au ralenti" dans le bactériome est à rapprocher de la réduction, de sept à deux, du nombre de copies du gène codant l'ARNr 23S. En effet, chez le genre *Mycoplasma*, Bercovier *et al.* (1986) ont montré l'existence d'une corrélation directe entre le nombre de copies de gènes ribosomaux et la vitesse de développement des bactéries.

La réduction de la taille du génome peut aussi être expliquée par un éventuel transfert de gènes depuis la bactérie jusqu'au noyau de l'hôte. Chez *Sitophilus oryzae* aucune preuve directe n'a pu être fournie à cette égard. Néanmoins, la dégénérescence apparente du génome bactérien ainsi que son intégration dans le métabolisme de l'hôte évoque la théorie de l'évolution par endosymbioses en série (§ A.3.1.) : les endocytobiotes de *Sitophilus oryzae* sont en train de devenir de véritables organites cellulaires. Cette hypothèse avait été émise par Nardon, en 1978, après la mise en évidence des interactions génétiques entre l'hôte et ses endocytobiotes chez

Sitophilus oryzae. Pour tenter de quantifier le niveau d'intégration des endocytobiotes, il serait très intéressant de comparer la taille de leur génome à celles des autres endocytobiotes de la famille des entérobactériacées. Malheureusement, aucune donnée n'est disponible pour le moment sur ces bactéries. C'est donc par l'analyse de la composition en C+G de l'ADN chromosomique que nous avons tenté d'effectuer cette comparaison.

Le taux de C+G de l'ADN des endocytobiotes de *Sitophilus oryzae* a été estimé à 54 %. Cette valeur est cohérente avec les taux de C+G de la famille des Enterobacteriaceae situés entre 49 et 59 % (Tableau C.1.3). Par contre, elle apparaît étonnamment élevée, si on la compare globalement aux taux observés chez les autres bactéries intracellulaires (Tableau A.3.1.). La même observation peut être faite à propos du taux de C+G en troisième position de codon (CGIII) du gène codant la protéine Hsp60. La valeur obtenue (62,5 %) a été comparée au CGIII des autres bactéries intracellulaires (Figure C.1.6.). Dans cette analyse les endocytobiotes de *Sitophilus oryzae* sont plus proches des bactéries extracellulaires que des bactéries intracellulaires.

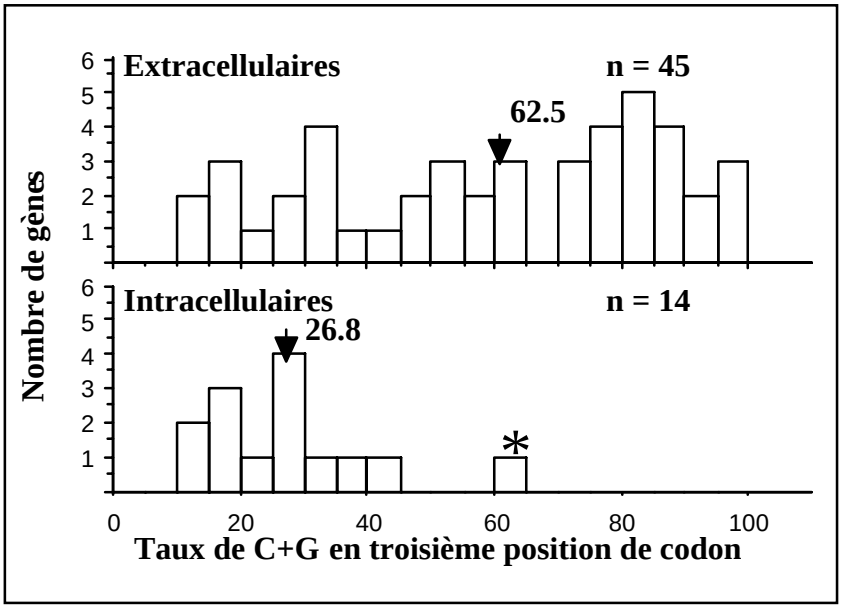


Figure C.1.6. : Histogramme de répartition des taux de C+G en troisième position de codon des gènes *hsp60* ; les médianes des distributions sont repérées par des flèches ; la position du gène des endocytobiotes de *Sitophilus oryzae* est repérée par une étoile.

Enfin, le taux de C+G du gène *rrs* des endocytobiotes de *Sitophilus oryzae* (CG16S) a été déterminé et comparé à celui des autres γ-protéobactéries intracellulaires et extracellulaires (Figure C.1.7.).

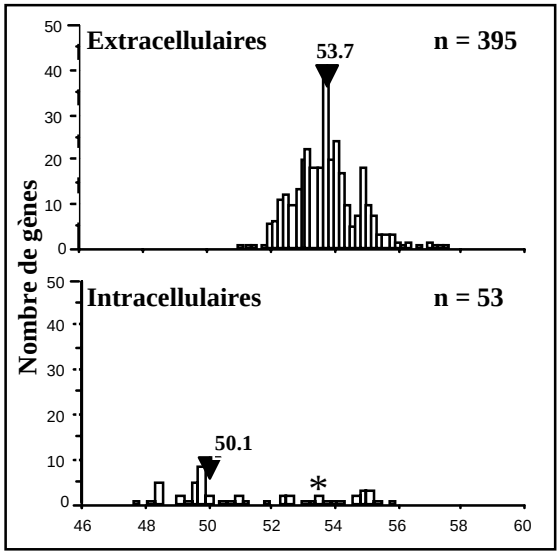


Figure C.1.7. : Histogramme de répartition des taux de C+G des gènes *rrs* ; les médianes des distributions sont repérées par des flèches ; la position du gène des endocytobiotes de *Sitophilus oryzae* est repérée par une étoile.

Selon ce critère, la position des endocytobiotes de *Sitophilus oryzae* (53,4 %) est plus proche de la médiane des bactéries extracellulaires (53,7 %) que de celle des bactéries intracellulaires (50,1 %). Cette analyse, basée sur un nombre plus important d'espèces que la précédente, montre cependant que d'autres bactéries intracellulaires possèdent des taux de C+G relativement élevés. Parmi celles-ci figurent les endocytobiotes du charançon *Sitophilus zeamais*, de la mouche *Glossina pallidipes*, de la punaise *Cimex lectularius*, de la cicadelle *Euscelidius variegatus*, de plusieurs mollusques bivalves, ainsi que les endocytobiotes secondaires du puceron *Acyrthosiphon pisum* et de l'aleurode *Bemisia tabaci*.

Finalement, la richesse en bases C et G de l'ADN des endocytobiotes de *Sitophilus oryzae* peut être interprétée de deux façons : (1) soit l'association symbiotique n'est pas assez ancienne pour que le génome symbiotique ait atteint sa composition d'équilibre ; (2) soit l'accumulation de bases A et T chez les bactéries intracellulaires n'est pas une caractéristique universelle. Il est difficile de trancher définitivement entre ces deux hypothèses puisque ni la taille des génomes, ni l'âge des intégrations des différents endocytobiotes du groupe des γ-protéobactéries ne sont connus pour le moment. Néanmoins, à la lumière de l'ensemble des résultats présentés dans la partie bibliographique de ce travail (§ A.3.3.2.), la première hypothèse paraît la plus probable.

La comparaison des usages de codons au niveau des gènes *hsp60* entre *Buchnera aphidicola*, *Escherichia coli* et les endocytobiotes de *Sitophilus oryzae* apporte un dernier argument en faveur de l'hypothèse d'association récente chez *Sitophilus oryzae* (Tableau C.1.4.). *Buchnera aphidicola* montre un usage de codon totalement biaisé et les codons finissant par A ou T sont systématiquement choisis chez cette bactérie. Chez *Escherichia coli*, l'usage de codon, pour ce

gène fortement exprimé, correspond parfaitement au choix des codons optimaux décrit par Ikemura (1985). Ces codons (en caractères gras dans le Tableau C.1.4.) sont les codons reconnus par les ARN de transfert isoaccepteurs les plus abondants chez *Escherichia coli* et *Salmonella typhimurium* (Sharp et Li, 1986). L'usage de codons des endocytobiotes de *Sitophilus oryzae* est très similaire à celui d'*Escherichia coli*. Les principales différences observées entre ces deux espèces sont liées au choix plus fréquent de codons finissant par C ou G (valine, alanine, glycine, lysine). Ces résultats montrent que, contrairement aux endocytobiotes du puceron, les endocytobiotes de *Sitophilus oryzae* ont conservé un usage de codon semblable à l'usage de codon des bactéries libres les plus proches.

Tableau C.1.4. : Usage de codon au niveau des gènes *hsp60* ; B : *Buchnera aphidicola* (Ohtaka *et al*., 1993) ; E : *Escherichia coli* (Hemmingsen *et al*., 1985) ; S : endocytobiote de *Sitophilus oryzae* ; les codons soulignés sont les codons optimaux au sens de Ikemura (1985) ; les nombres imprimés en caractères gras correspondent aux codons majoritairement choisis.

Codon	B	E	S	Codon	B	E	S	Codon	B	E	S
UUA (Leu)	**31**	1	0	AGA (Arg)	2	0	0	AGU (Ser)	5	0	0
UUG (Leu)	2	1	2	AGG (Arg)	0	0	0	AGC (Ser)	1	1	3
CUU (Leu)	3	0	6	CGU (Arg)	**16**	**17**	**10**	UCU (Ser)	**25**	**11**	2
CUC (Leu)	0	1	1	CGC (Arg)	2	5	**13**	UCC (Ser)	2	5	**13**
CUA (Leu)	6	0	0	CGA (Arg)	2	0	0	UCA (Ser)	5	0	1
CUG (Leu)	1	**38**	**30**	CGG (Arg)	0	0	0	UCG (Ser)	0	0	1
GUU (Val)	**24**	**30**	**16**	GCU (Ala)	**23**	**34**	**17**	GGU (Gly)	**34**	**28**	**19**
GUC (Val)	3	2	**12**	GCC (Ala)	3	3	**31**	GGC (Gly)	2	**31**	**34**
GUA (Val)	**26**	**14**	**12**	GCA (Ala)	**31**	**25**	5	GGA (Gly)	**17**	0	0
GUG (Val)	2	**12**	**18**	GCG (Ala)	1	**13**	**18**	GGG (Gly)	2	0	2
ACU (Thr)	**13**	8	2	CCU (Pro)	4	1	4	AUU (Ile)	**23**	3	9
ACC (Thr)	1	**25**	**27**	CCC (Pro)	0	0	0	AUC (Ile)	5	**30**	**26**
ACA (Thr)	**13**	0	0	CCA (Pro)	**11**	3	1	AUA (Ile)	6	0	0
ACG (Thr)	0	0	2	CCG (Pro)	0	**10**	**10**	AUG (Met)	**22**	**22**	**22**
UUU (Phe)	**6**	0	1	CAU (His)	2	0	0	UAU (Tyr)	**7**	0	**3**
UUC (Phe)	1	**7**	**6**	CAC (His)	1	1	1	UAC (Tyr)	1	**7**	**3**
UGU (Cys)	**2**	0	**1**	CAA (Gln)	**12**	0	2	AAA (Lys)	**43**	**37**	**32**
UGC (Cys)	0	**3**	**1**	CAG (Gln)	3	**16**	**13**	AAG (Lys)	0	3	**10**
AAU (Asn)	**15**	1	**7**	GAU (Asp)	**28**	**10**	**16**	GAA (Glu)	**46**	**43**	**38**
AAC (Asn)	**6**	**18**	**13**	GAC (Asp)	5	**25**	**19**	GAG (Glu)	1	3	9

C.2 ETUDE DES INTERACTIONS MOLECULAIRES ENTRE LE CHARANÇON *Sitophilus oryzae* ET SA PRINCIPALE BACTERIE SYMBIOTIQUE

C.2.1. Comparaison des profils électrophorétiques des souches symbiotique et aposymbiotique de *Sitophilus oryzae*

La formation d'une endocytobiose peut être considérée comme la “mise en commun” de deux ou plusieurs génomes dans le but d'assurer la survie et l'adaptation au milieu de la nouvelle entité formée : le symbiocosme. Cette association ne se traduit pas par une simple relation d’additivité des génomes de l’hôte [H] et des endocytobiotes [S], mais des mécanismes d'interactions vont se mettre en place très rapidement. Ceux-ci se traduiront physiquement chez l'hôte et chez le symbiote par l'activation ou l'inhibition de l'expression de gènes spécifiques. Chez *Sitophilus oryzae,* la symbiose peut être rompue ; les expressions des trois entités (hôte [H], endocytobiotes [S] et hôte+symbiotes [HS]) peuvent donc être analysées et comparées. La différence [i] = [HS] - [H] - [S] sera alors imputée au facteur d'interaction entre l’hôte et ses endocytobiotes (Nardon, 1978, Nardon et Wicker, 1981).

Dans cette étude, nous avons comparé les profils d'électrophorèse bidimensionnelle des protéines cytosolubles des souches symbiotique et aposymbiotique de *Sitophilus oryzae* (Figure C.2.1). Les différences observées entre les deux souches concernent essentiellement quatre protéines dont deux semblent être d’origine procaryote. Les résultats de la comparaison sont présentés dans le Tableau C.2.1. Il est à noter que seules les protéines cytosolubles ont été analysées dans ce travail. En effet, le charançon contient des quantités importantes de protéines de stockage (tyraustorines) qui forment, dans les broyats, des globules insolubles (Delobel *et al*., 1993). Ces protéines doivent donc être éliminées pour permettre l’analyse par électrophorèse bidimensionnelle. Une centrifugation légère des échantillons permet le “culottage” de ces globules (*cf.* § B.3.5.2), la contrepartie étant l’élimination simultanée de la majorité des protéines membranaires.

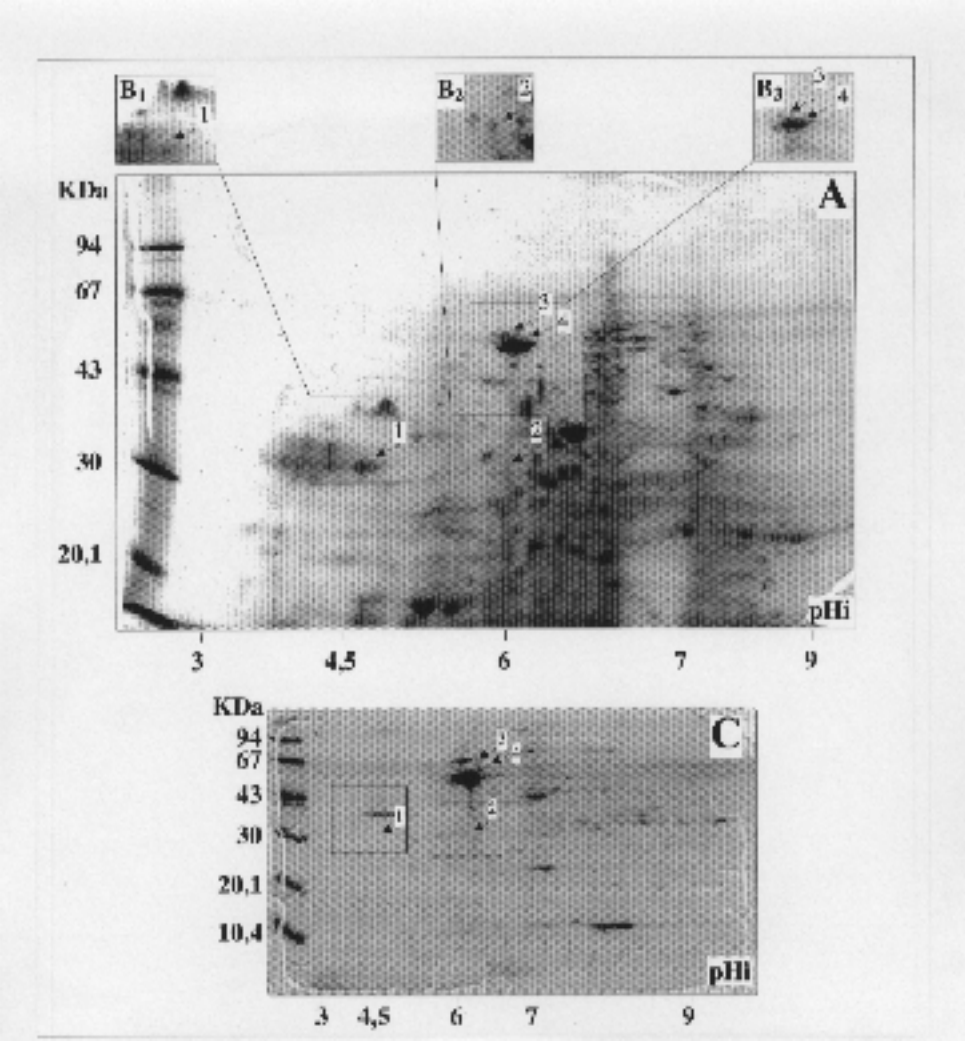


Figure C.2.1. : Profils d'électrophorèse bidimensionnelle de la soche souche symbiotique (A) de Sitophilus oryzae. Les différences observées (protéines 1 à 4) avec la souche aposymbiotique sont reportées au dessus de la figure A (B1, B2 et B3) ; (C) : Profil des endocytobiotes isolés.

Les résultats d'électrophorèse présentés Figure C.2.1 ont été obtenus à partir d'un échantillon d'environ 150 larves pour chaque souche. Les différences observées ne peuvent donc pas être imputées à une éventuelle variabilité individuelle. De plus, ces différences sont reproductibles d'une expérience à l'autre (environ 20 gels d'électrophorèse, colorés à l'argent ou au bleu de Coomassie, ont été analysés pour chaque souche).

Tableau C.2.1 : Résultats de la comparaison des profils d'électrophorèse bidimensionnelle des souches symbiotique et aposymbiotique de *Sitophilus oryzae* et des endocytobiotes ; (+) expression forte ; (++) expression très forte ; (-) expression nulle ; (ND) non déterminée.

Protéine N°	PM (kDa)	pHi	souche symbiotique	souche aposymbiotique	endocytobiotes isolés
1	30	4,6	+	-	-
2	33	6,1	-	+	ND
3	61	6,0	+	-	+
4	58	6,1	++	+	++

Afin de confirmer ces résultats, des comparaisons de profils d'électrophorèse ont été réalisées après injection de méthionine marquée au ^{35}S dans l'hémolymphe des larves des deux souches. L'analyse des profils protéiques (Figure C.2.2) a permis de confirmer les différences observées pour les protéines 1, 3 et 4. La protéine 2 n'a pas été localisée avec précision sur les films d'autoradiographie.

L'analyse de ces deux expériences montre que la souche symbiotique de *Sitophilus oryzae* synthétise une protéine de 30 kDa (pHi = 4,6) qui n'est trouvée ni dans la souche aposymbiotique, ni dans les endocytobiotes (protéine n°1). Cette protéine semble produite par le génome hôte en réponse à la présence des endocytobiotes. Elle n'a pour le moment pas été localisée, ni identifiée. L'analyse de profils d'électrophorèse bidimensionnelle de bactériomes larvaires isolés (données non présentées) a montré qu'elle ne s'accumule pas dans cet organe.

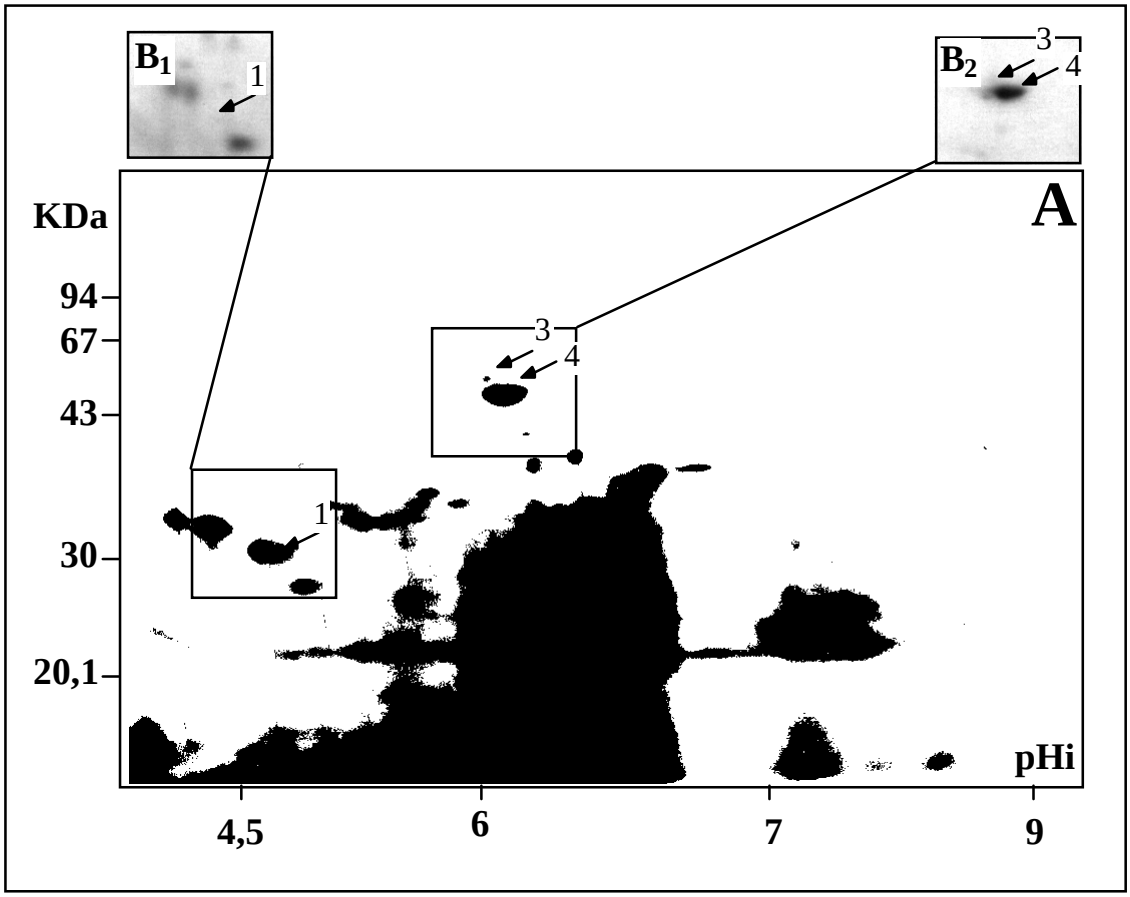


Figure C.2.2 : Comparaison des profils d'électrophorèse bidimensionnelle des protéines néosynthétisées par les souches symbiotique (A) et aposymbiotique (B1 et B2).

La souche aposymbiotique synthétise une protéine spécifique de 33 kDa (pHi = 6,1) qui n'a pas été trouvée dans la souche symbiotique (protéine n°2). Cette protéine n'a pas été identifiée, ni localisée pour le moment.

La protéine n°3 (PM = 61kDa ; pHi = 6,0) est absente de la souche aposymbiotique mais elle est présente en quantité importante dans les endocytobiotes. Cette protéine d'origine symbiotique n'est donc pas une protéine "d'interaction" dans le sens défini précédemment et n'a pour le moment pas été identifiée.

Enfin, la protéine n°4 (PM = 58 kDa ; pHi = 6,1) est exprimée de façon plus importante dans la souche symbiotique que dans la souche aposymbiotique. Cette protéine est majoritairement présente dans les endocytobiotes et a pu être identifiée, grâce à un anticorps anti-GroEL, comme appartenant à la famille des Hsp60. Cette protéine, d'origine procaryote, a été décrite dans différents modèles d'endocytobiose (§ A.5.3.) et pourrait avoir un rôle important dans les relations hôte / endocytobiotes. Elle sera plus particulièrement étudiée dans le chapitre suivant. Le "spot" observé dans la souche aposymbiotique correspond à la protéine Hsp60 mitochondriale. Cette hypothèse a été vérifiée sur un profil d'électrophorèse bidimensionnelle de mitochondries isolées (donnée non présentée).

L’ensemble de ces résultats semble montrer que l’expression du génome hôte est modifiée par la présence ou l’absence des endocytobiotes. Il est néanmoins possible d'expliquer aussi les différences observées entre les deux souches (protéines 1 et 2), soit par la sélection drastique qui a été opérée lors de l’obtention de la souche aposymbiotique (moins de 5 % de la population initiale a survécu au traitement thermique), soit par une dérive génétique de l’une des deux souches depuis leur séparation en 1978. Pour tester ces deux dernières hypothèses, il serait intéressant d’une part de sélectionner une nouvelle souche aposymbiotique de *Sitophilus oryzae* et de regarder si les mêmes différences sont retrouvées, et d’autre part, de refaire les mêmes observations sur d’autres souches ou espèces du genre *Sitophilus*.

C.2.2. Étude de la protéine Hsp60 des endocytobiotes de *Sitophilus oryzae*

C.2.2.1. Caractérisation immunologique de la protéine Hsp60 des endocytobiotes de *Sitophilus oryzae*

L'utilisation d'anticorps polyclonaux anti-GroES et anti-GroEL nous a permis de montrer la présence de protéines Hsp10 et Hsp60 en quantité importante sur les coupes microscopiques des trois souches granivores de *Sitophilus* : *Sitophilus oryzae*, *Sitophilus zeamais* et *Sitophilus granarius*. L'espèce naturellement asymbiotique, *Sitophilus linearis*, a été utilisée comme témoin négatif dans cette étude (données non présentées). L'intensité de la coloration des bactériomes des larves et des adultes s'est révélée la plus forte chez *Sitophilus granarius* (Figure C.2.3). Il est possible que les endocytobiotes de cette espèce accumulent plus de protéines Hsp10 et Hsp60, ou alors que ces dernières possèdent une affinité plus forte pour les deux anticorps utilisés. Ce dernier point n’a pas été élucidé. Enfin, l'observation des coupes à fort grossissement montre que ces deux protéines ne sont pas (ou peu) excrétées en dehors du bactériome puisqu’aucune autre structure que les bactériomes de l'insecte hôte ne fixe l’un ou l’autre des anticorps.

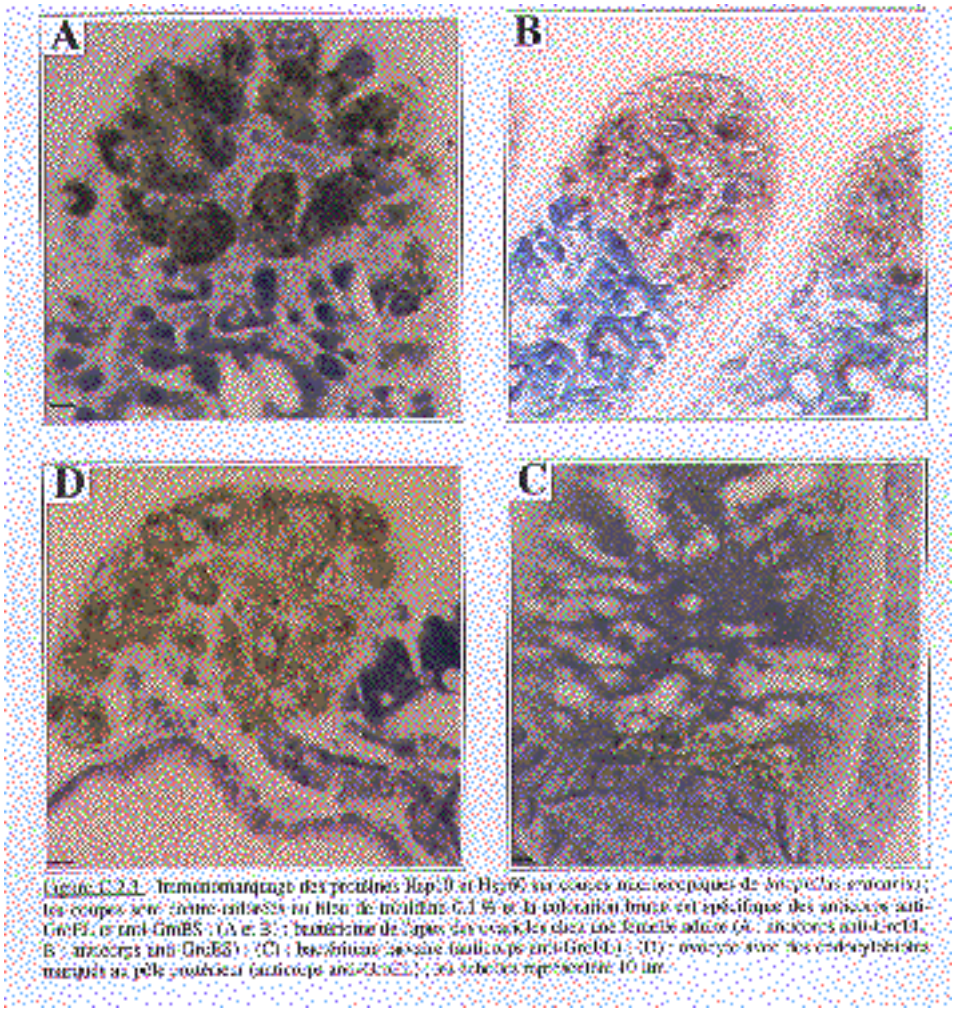


Figure C.2.3 : Immunomarquage des protéines Hsp10 et Hsp60 sur coupes microscopiques de *Sitophilus granarius* ; les coupes sont contre-colorées au bleu de toluidine 0,1 % et la coloration brune est spécifique des anticorps anti-GroEL et anti-GroES ; (A et B) : bactériome de l'apex des ovarioles chez une femelle adulte (A : anticorps anti-GroEL, B : anticorps anti-GroES) ; (C) : bactériome larvaire (anticorps anti-GroEL) ; (D) : ovocyte avec des endocytobiotes marqués au pôle postérieur (anticorps anti-GroEL) ; les échelles représentent 10 µm.

Les protéines Hsp10 et Hsp60 ont également été visualisées par “Western blot” chez *Sitophilus oryzae* (Figure C.2.4). Des poids moléculaires d’environ 12 et 58 kDa ont été trouvés respectivement pour ces deux chaperons. La protéine Hsp10 n’a pas été détectée dans l’extrait brut de larves symbiotiques de *Sitophilus oryzae* (Figure C.2.4., puit n°5). Il est possible que, comme c’est le cas chez de nombreuses bactéries intracellulaires (§ A.5.3.2.), la protéine Hsp10 soit synthétisée en quantité relativement moins importante que la protéine Hsp60 dans les endocytobiotes de *Sitophilus oryzae*. Les plus faibles intensités des bandes Hsp10 relativement aux bandes Hsp60 appuient ces constatations.

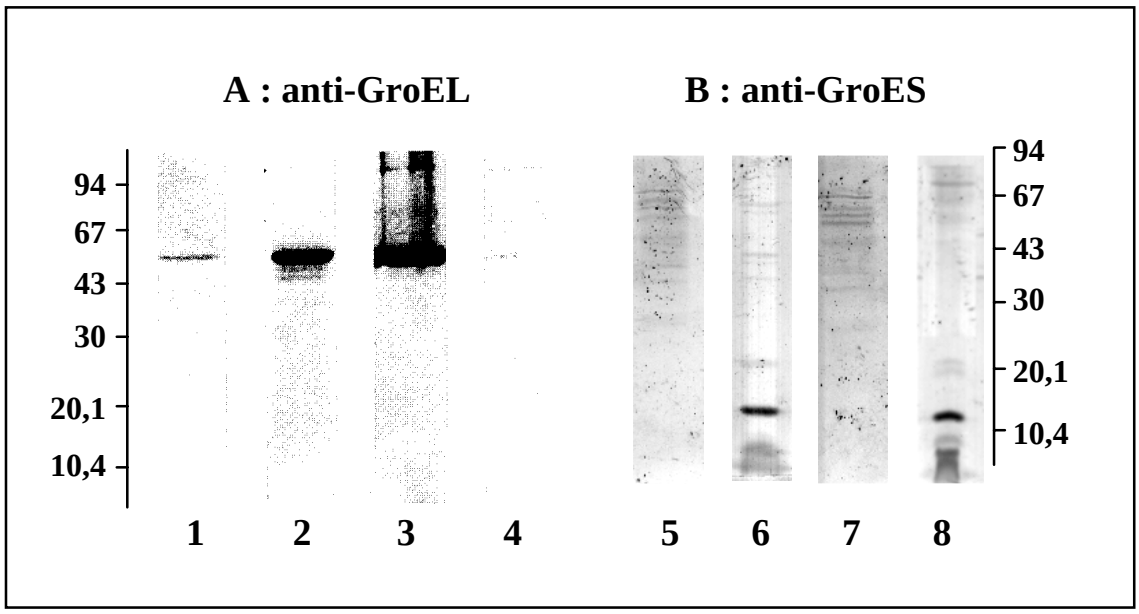


Figure C.2.4 : Mise en évidence par “Western blot” de la présence des protéines Hsp60 (A) et Hsp10 (B) chez *Sitophilus oryzae* ; (1 et 5) : souche symbiotique ; (2 et 6) : bactériomes isolés ; (3) : endocytobiotes isolés ; (4 et 7) : souche aposymbiotique ; (8) : *Escherichia coli.*

Afin de déterminer si la protéine Hsp60 est excrétée dans l'hémolymphe de l'insecte hôte, des dosages ELISA ont été réalisés. Le puceron du pois *Acyrthosiphon pisum*, chez qui une telle excrétion a été décrite (Van den Heuvel, 1994), a été utilisé comme témoin positif dans cette étude. Il faut souligner que les résultats présentés ici sont plus qualitatifs que quantitatifs et ceci pour plusieurs raisons méthodologiques. Premièrement, le kit de coloration utilisé (Vectastain Elite ABC, Vector) n'est en théorie pas adapté aux dosages quantitatifs ; deuxièmement, une courbe d’étalonnage de concentration n'a pas pu être réalisée puisque nous ne disposions pas de protéine Hsp60 purifiée en quantité suffisante ; enfin, il n’est théoriquement pas possible de comparer les dosages de deux antigènes différents sans connaître leurs affinités respectives pour l’anticorps. Les valeurs des densités optiques (DO) ont donc finalement été ramenées à une masse de tissu frais équivalente à 4 mg (masse d'une larve de *Sitophilus oryzae* au quatrième stade) et ont directement été reportées sur le graphe de la Figure C.2.5.

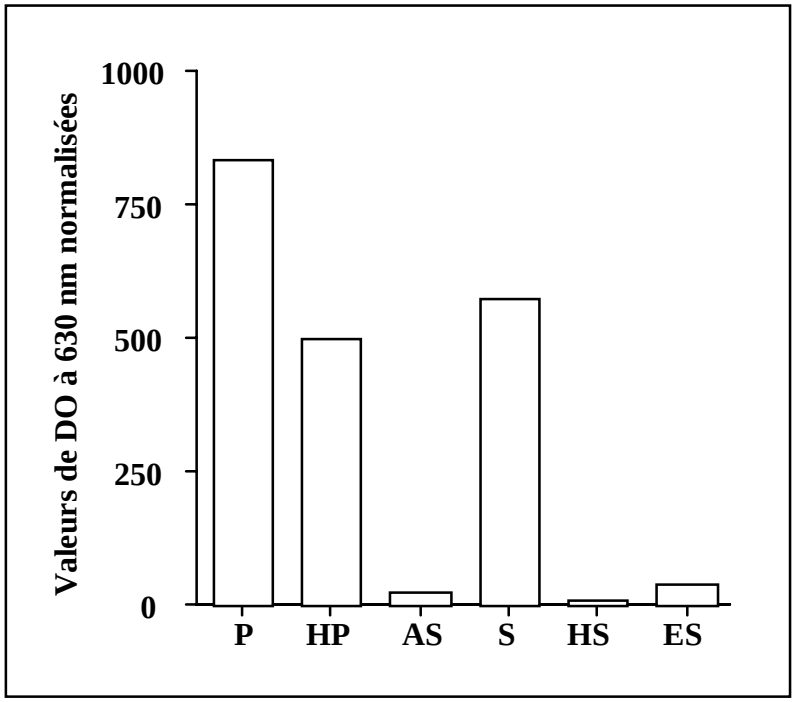


Figure C.2.5 : Dosage ELISA de la concentration en protéine Hsp60 dans l'hémolymphe et les excréments de *Sitophilus oryzae*. Les DO obtenues ont été ramenées à un équivalent de 4 mg d'échantillon frais ; (P) : puceron *Acyrthosiphon pisum* ; (HP) : hémolymphe de puceron prélevée à l'aide d'une microseringue après avoir coupé une patte à l'insecte ; (AS) : souche aposymbiotique de *Sitophilus oryzae* ; (S) : souche symbiotique de *Sitophilus oryzae* ; (HS) : hémolymphe de *Sitophilus oryzae* prélevée à la microseringue en piquant la partie postérieure d'une larve de quatrième stade ; (ES) : excréments de la souche symbiotique de *Sitophilus oryzae.*

Ces résultats montrent que la protéine Hsp60 des endocytobiotes de *Sitophilus oryzae*, à moins qu'elle ne soit rapidement dégradée, n'est pas (ou très peu) excrétée dans l'hémolymphe et dans les excréments du charançon. Les traces d'antigènes détectées dans ces compartiments, ainsi que dans la souche aposymbiotique, peuvent être attribuées à des réactions croisées avec les protéines Hsp60 des *Wolbachia* ou des mitochondries.

C.2.2.2. Purification de la protéine Hsp60 des endocytobiotes de *Sitophilus oryzae*

Afin d'étudier les caractéristiques biochimiques de la protéine Hsp60 des endocytobiotes de *Sitophilus oryzae*, sa purification a été entreprise. Cette purification n'a pas été réalisée à partir d'extraits de larves entières à cause de la présence, dans le tissu adipeux de l'insecte notamment, des protéines Hsp60 des *Wolbachia* et des mitochondries. C'est donc à partir des endocytobiotes isolés des bactériomes larvaires que nous avons débuté ce travail. La protéine Hsp60 est la protéine majoritaire des endocytobiotes. Une seule étape de chromatographie sur colonne de DEAE-cellulose dans un gradient de NaCl a suffi pour la purifier. La Figure C.2.6

présente les différentes étapes du gradient et les profils des pics obtenus en sortie de colonne ainsi que leur contenu analysé par électrophorèse. La protéine Hsp60 est éluée à partir de 400 mM de NaCl dans un tampon [Tris HCl 0,1 M (pH = 7,5)], mais la concentration en NaCl doit être élevée à 800 mM pour décrocher complètement le pic. Il semble donc que cette protéine possède une affinité particulière pour la résine non liée à sa charge. En conséquence, il serait souhaitable de tester d'autres types de matrice pour améliorer la purification, mais ces tests n'ont pas été réalisés dans le cadre de ce travail.

Les quantités de protéine Hsp60 obtenues sont extrêmement faibles : 10 à 20 μg de la protéine pure sont isolés à partir de 500 larves de quatrième stade (2 g de poids frais), soit un rendement total de 0,001 %. Le même rendement a été obtenu par Hara et Ishikawa (1990) pour la purification de la protéine Hsp60 des endocytobiotes du puceron du pois. L'étape limitante de ce protocole est la dissection des bactériomes larvaires sous la loupe binoculaire. Ainsi, l'obtention de 1 mg de protéine pure nécessiterait la dissection d'environ 25 000 larves, c'est-à-dire à peu près 50 jours de travail de dissection ininterrompus ! Le clonage et l'expression chez *Escherichia coli* du gène codant la protéine Hsp60 des endocytobiotes de *Sitophilus oryzae*, nous a semblé être une alternative plus rentable pour obtenir des quantités suffisantes de la protéine purifiée. C'est pourquoi la partie biochimique de ce travail a été interrompue à ce stade.

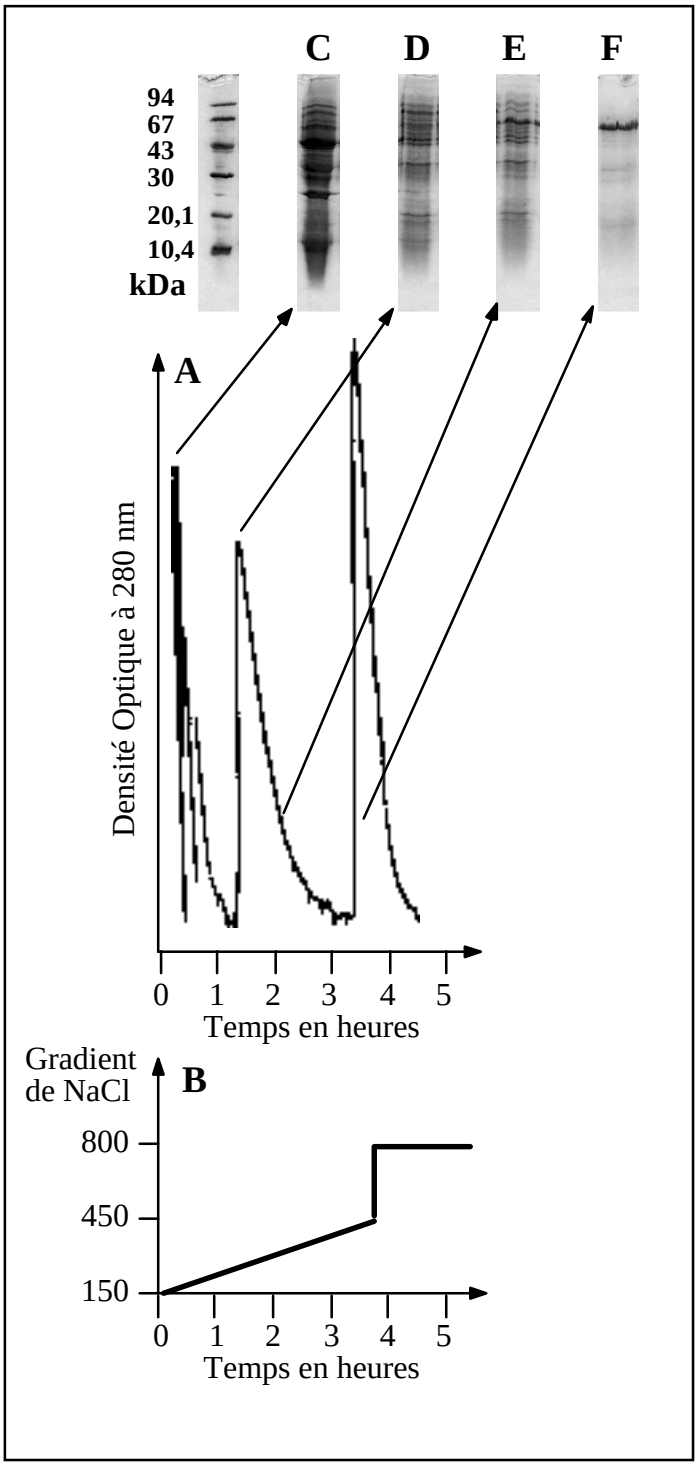


Figure C.2.6 : Purification de la protéine Hsp60 des endocytobiotes de *Sitophilus oryzae* sur colonne de DEAE-cellulose ; (A) : profil d'élution ; (B) : étape du gradient de NaCl ; (C, D, E et F) : contenus des pics analysés par électrophorèse.

C.2.2.3. Clonage et séquençage du gène codant la protéine Hsp60

Le clonage du gène codant la protéine Hsp60 a tout d'abord été tenté par complémentation de mutations GroE$^-$ d'*Escherichia coli* (souches GroEL$^-$ (OFB858) et GroES$^-$ (OFB820) fournies par le Professeur Fayet que nous remercions chaleureusement). Ces mutants se caractérisent par un phénotype létal à 43°C. Dans cette expérience, une banque d'ADN a été réalisée en insérant l'ADN des endocytobiotes de *Sitophilus oryzae*, partiellement digéré par l'enzyme *Sau3A*, dans un plasmide pUC18. Cette banque a ensuite été utilisée pour transformer les deux souches mutantes OFB858 et OFB820, mais aucun clone viable à 43°C n'a été isolé selon cette méthode. Ce résultat négatif peut s'interpréter de deux façons : soit la protéine Hsp60 des endocytobiotes de *Sitophilus oryzae* ne permet pas la complémentation des mutations GroE$^-$ d'*Escherichia coli* ; soit le fragment à cloner est sous-représenté dans la banque d'ADN et n'a pas pu être mis en évidence.

Un criblage par hybridation de deux autres banques d'ADN issues de digestions totales par les enzymes *EcoR I* et *BamH I*, ces enzymes ayant été choisies par des expériences de "Southern blot", a alors été tenté. La sonde utilisée est un fragment *BamH I - ApaL I* de 1400 pb codant la protéine GroEL d'*Escherichia coli* et issu du plasmide p602. Cette fois encore, le séquençage des clones isolés par cette technique n'a pas permis d'isoler les gènes codant les protéines Hsp10 ou Hsp60 des endocytobiotes du charançon.

La difficulté à obtenir de l'ADN d'endocytobiotes (non cultivables) en quantité importante peut expliquer en partie la mauvaise qualité des banques utilisées et les résultats négatifs de ces deux techniques. Un clonage par PCR a finalement été réalisé afin de contourner ce problème.

Pour débuter ce travail, les séquences des gènes *hsp60* de huit γ-protéobactéries supposées proches des endocytobiotes de *Sitophilus oryzae* ont été alignées (la position phylogénétique précise de cette bactérie n'étant pas connue à ce stade du travail). Cet alignement a alors permis la construction de deux amorces dégénérées (P3 et P5) distantes de 700 pb à l'intérieur du gène *hsp60* (P5 : $_{5'}$ggggtaccAARGAATGGCGTNTCNGTNGC$_{3'}$; P3 : $_{5'}$cgggatccGAAR-CCMGGNGCYTTNACNGC$_{3'}$). Les deux sites de restriction *BamH I* et *Kpn I*, soulignés ci-dessus, ont été ajoutés aux extrémités 5' de ces amorces pour faciliter, par la suite, le clonage du fragment amplifié. Afin de vérifier la spécificité des amorces, l'ADN extrait de la souche aposymbiotique de *Sitophilus oryzae* contenant à la fois des mitochondries et des *Wolbachia*, a été utilisé comme témoin négatif et le plasmide p602 comme témoin positif. Les résultats d'amplification sont présentés sur la Figure C.2.7. et montrent l'amplification d'un fragment spécifique de 700 pb.

Ce produit d'amplification a été cloné dans un vecteur pUC18 et séquencé sur les deux brins (plasmide SymI). L'analyse de sa séquence a montré une homologie très forte (82 %) avec le gène *groEL* d'*Escherichia coli* (données non présentées).

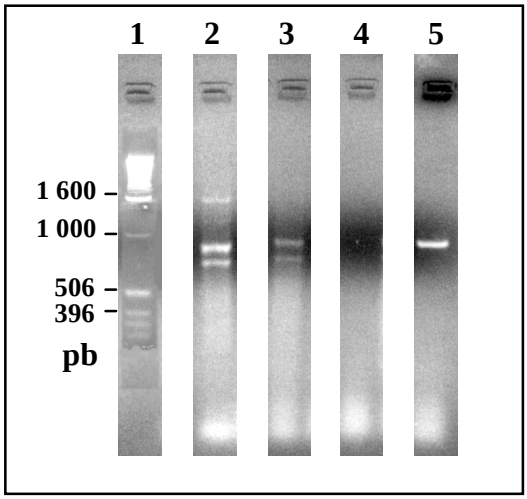


Figure C.2.7 : Amplification par PCR d'un fragment de 700 pb à l'intérieur du gène *hsp60* des endocytobiotes de *Sitophilus oryzae* ; (1) : échelle de poids moléculaires ; (2) l'ADN d'endocytobiotes est utilisé comme matrice dans la réaction ; (3 et 4) ADN de larves symbiotique et aposymbiotique ; (5) plasmide p602.

C'est grâce à cette homologie que nous avons finalement pu construire une autre paire d'amorces dégénérées (MES2F et SEL2R) dans des régions beaucoup moins conservées des gènes *hsp10* et *hsp60*. Ces deux amorces sont situées aux extrémités des parties codantes de l'opéron *groE*, c'est à dire au niveau du codon Start du gène *hsp10* (MES2F) et du codon Stop du gène *hsp60*. Elles sont distantes d'environ 2 kb chez *Escherichia coli*. Les résultats d'amplification sont présentés sur la Figure C.2.8. Les séquences des amorces utilisées dans cette analyse sont MES2F : $_{5'}$ATGAATATTCGCCATTRCAYGA$_{3'}$ et SEL2R : $_{5'}$CATCA-TNCCNCC-CATNCCNCC$_{3'}$.

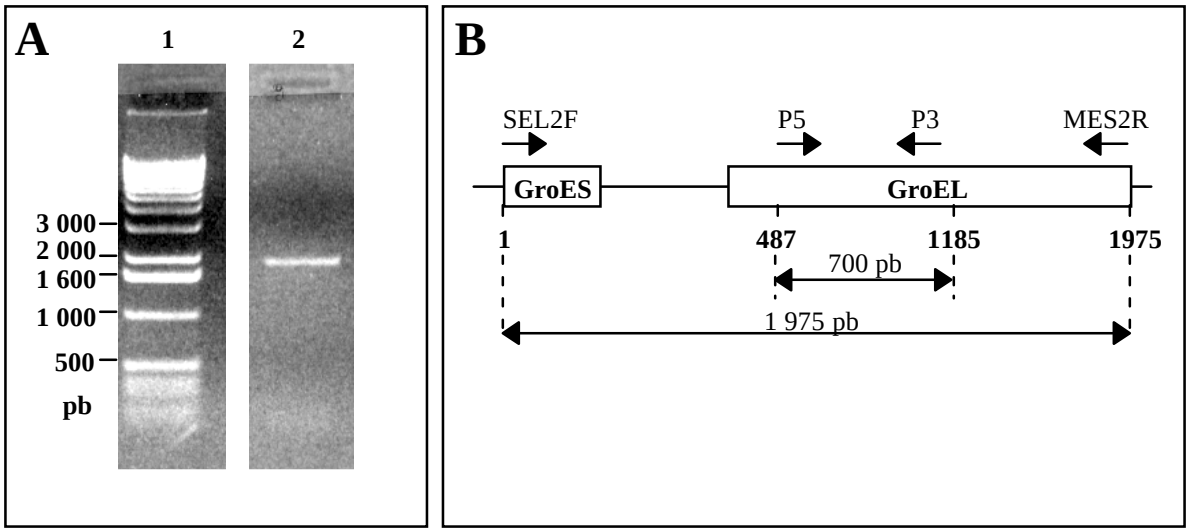


Figure C.2.8 : Amplification d'un fragment de 2 kb dans la partie codante de l'opéron *groE* des endocyto-biotes de *Sitophilus oryzae* ; (A) : réaction de PCR ; (B) : position sur l'opéron *groE* d'*Escherichia coli* des quatre amorces utilisées dans ce travail.



Figure C.2.9 : Séquence de l'opéron *groE* des endocytobiotes de *Sitophilus oryzae* ; les nucléotides substitués chez *Escherichia coli* sont reportés au dessus de la séquence ; les codons "Start" et "Stop" sont imprimés en caractères gras ; --SD-- : séquence de Shine-Dalgarno ; les séquences des primers MES2F et SEL2R sont soulignées ; la partie non codante, située entre les gènes *hsp10* et *hsp60*, est soulignée en pointillés.

Le fragment amplifié a été directement cloné (plasmide SymIII) dans un vecteur ouvert en T (pMos*Blue*, Amersham) et séquencé sur les deux brins par l'entreprise Genome Express (Figure C.2.9.). L'opéron *groE* des endocytobiotes de *Sitophilus oryzae* est composé des gènes *hsp10* (291 pb) et *hsp60* (1636 pb). Ces deux gènes sont espacés de 46 pb et le gène *hsp10* est en amont du gène *hsp60*. Des homologies de 86 et 82 % ont été trouvées avec les gènes *groES* et *groEL* d'*Escherichia coli*. Les gènes *hsp10* et *hsp60* codent respectivement des protéines de 10,4 kDa ($pI_{théorique}$ = 7,2) et 57,2 kDa ($pI_{théorique}$ = 7,3) dont les séquences d'acides aminés ont été comparées aux séquences des protéines GroES et GroEL d'*Escherichia coli* (Figure C.2.10.). Des homologies de 92,8 % (Hsp10) et 91,2 % (Hsp60) ont été trouvées entre les protéines de ces deux bactéries. Enfin, 28 % (Hsp10) et 56 % (Hsp60) des substitutions d'acides aminés observées sont conservatives(1).

Les souches d'*Escherichia coli* NM522 transformées avec le plasmide SymIII poussent très difficilement en milieu liquide et le rendement d'extraction d'ADN plasmidique selon le protocole de routine (miniprep) décrit au paragraphe B.4.3. a été systématiquement faible dans nos expériences. Par contre, la même souche transformée avec le plasmide SymIV (plasmide SymIII portant une délétion de 400 pb au début de l'insert) ne montre pas ces caractéristiques. Nous avons donc émis l'hypothèse que l'expression d'un des deux gènes *hsp10* ou *hsp60* des endocytobiotes dans le plasmide est responsable de l'effet négatif sur la croissance d'*Escherichia coli*. Le promoteur *lacZ*, situé à proximité du site d'insertion dans le plasmide pMos*blue*, ne peut pas être responsable de cette expression, dans la mesure où l'insert est cloné à l'envers par rapport à lui. Il faut donc envisager qu'un autre promoteur du plasmide ou qu'un promoteur interne soit présent, et fonctionnel chez *Escherichia coli*, à l'intérieur de la séquence de l'opéron *groE* des endocytobiotes de *Sitophilus oryzae*. Les séquences consensus des promoteurs classiques (σ32, σ70, σ60) ont donc été recherchées dans l'insert du plasmide SymIII, ainsi que les promoteurs spécifiques (P2a et P2b) de l'opéron *groE* des endocytobiotes de l'amibe (Ahn *et al*., 1994). Mais aucune structure significative n'a pu être mise en évidence. Enfin, des essais de complémentation de mutants GroEL$^-$ et GroES$^-$ (souches OFB 858 et OFB 820) ont été réalisés avec le plasmide SymIII. Comme aucun résultat positif n'a pu être obtenu, il n'a pas été possible de conclure sur une expression éventuelle de l'insert cloné dans le plasmide SymIII.

(1) Les substitutions conservatives considérées dans cette partie du travail sont basées sur des critères biochimiques (taille et hydrophobicité des acides aminés) ; elles ont été déterminées par le logiciel MacMollyTetra (Vahrson et Wittig, 1994).

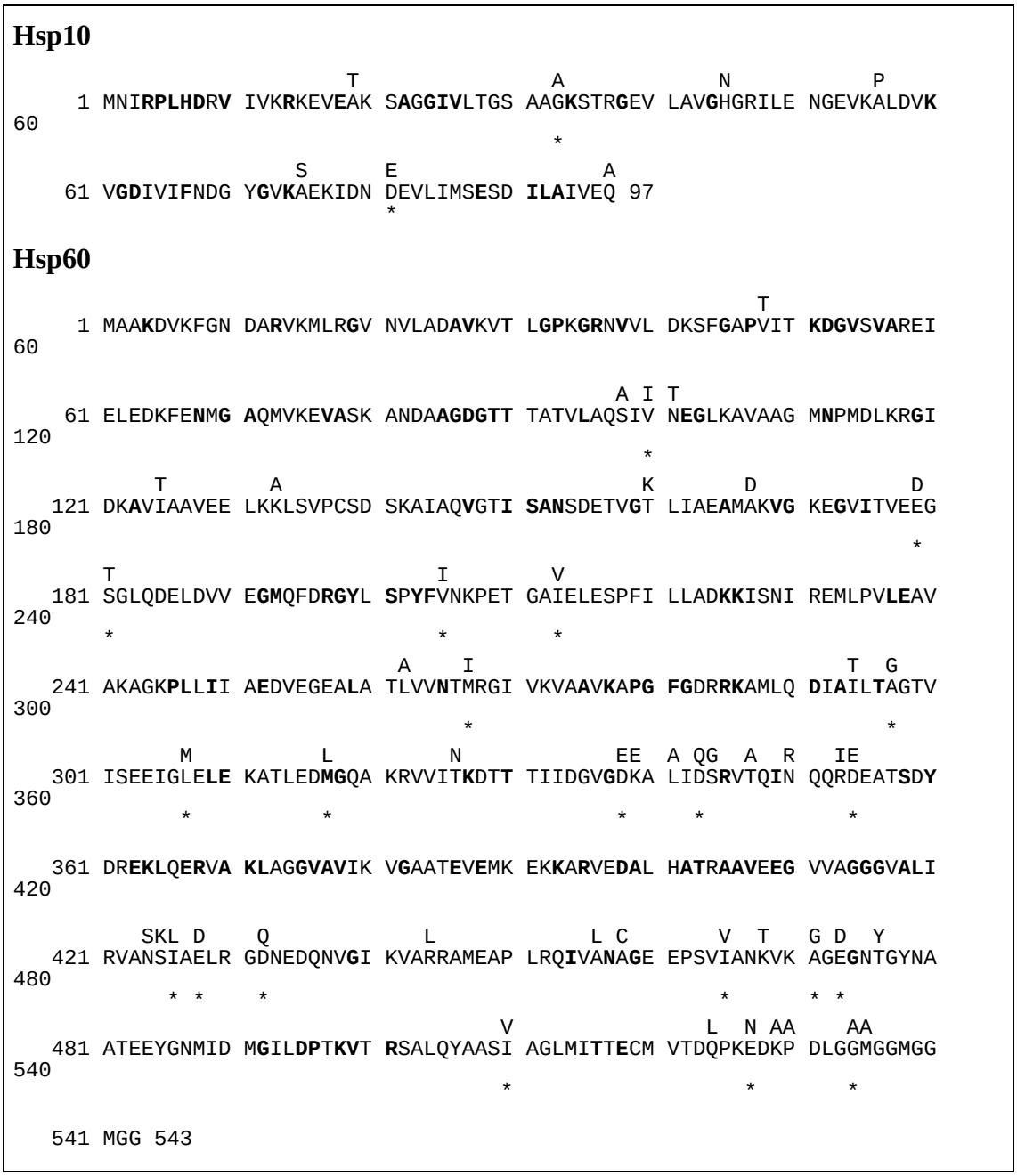


Figure C.2.10. : Séquences des protéines Hsp10 et Hsp60 des endocytobiotes de *Sitophilus oryzae* ; les acides aminés substitués chez *Escherichia coli* sont reportés au-dessus des deux séquences ; (*) : substitution conservative ; les acides aminés imprimés en caractères gras correspondent, pour la protéine Hsp10, aux acides aminés conservés dans les dix séquences d'Hsp10 de γ-protéobactéries trouvées dans la base de données Swissprot data base, et pour la protéine Hsp60, aux acides aminés conservés dans au moins 49 séquences sur les 50 disponibles dans la même base (d'après Fenton *et al.*, 1994).

C.2.2.4. Etude de l'expression du gène *hsp60* des endocytobiotes de *Sitophilus oryzae*

C.2.2.4.1. Comparaison de l'expression protéique *in vitro* et *ex vivo* des endocytobiotes des larves de *Sitophilus oryzae*

Une première étude par marquage radioactif des protéines néosynthétisées a permis de comparer les profils d'expression protéique des endocytobiotes de *Sitophilus oryzae in vitro* et

ex vivo. Le profil *in vitro* correspond aux endocytobiotes isolés et incubés une heure dans un milieu de survie contenant de la méthionine marquée au ^{35}S (§ B.3.5.3.2.). Le profil *ex vivo* correspond aux synthèses des bactériomes larvaires disséqués et incubés une heure dans le même milieu de survie. La Figure C.2.12. présente les résultats obtenus par électrophorèse mono- et bidimensionnelle.

Les endocytobiotes isolés produisent un nombre important de protéines (Figure C.2.12., A1 et A2). Une centaine de "spots" peuvent être comptabilisés sur le gel d'électrophorèse bidimensionnelle correspondant. Parmi ces protéines, la protéine Hsp60 représente environ 10 % du total des néosynthèses. Ce pourcentage a été estimé après intégration des bandes du profil d'électrophorèse monodimensionnelle.

Les profils *ex vivo* sont par contre très différents (Figure C.2.12., B1 et B2). Tout d'abord, l'activité globale de synthèse *ex vivo* paraît beaucoup plus faible qu'*in vitro*. L'hypothèse d'une activité cellulaire réduite des endocytobiotes à l'intérieur des bactériomes larvaires peut être avancée, d'autant plus qu'elle est en accord avec le faible nombre de cycles de division de ces bactéries durant le développement de la larve (Nardon, 1978). Néanmoins, cette différence peut être expliquée par le fait que la méthionine radioactive est moins accessible aux endocytobiotes lorsqu'ils sont à l'intérieur des bactériomes. En effet, dans ce cas, elle doit traverser la membrane des bactériocytes pour accéder aux endocytobiotes. Une exposition plus longue des films d'autoradiographie des profils des bactériomes permet de compenser en partie ces différences.

Un autre aspect remarquable de cette étude concerne la protéine Hsp60. En effet, cette protéine apparaît sous la forme d'un double "spot" (PM = 58 kDa, pHi = 6) sur le profil *ex vivo*. Cette observation a été vérifiée par immunomarquage en utilisant l'anticorps anti-*groEL* décrit précédemment (données non présentées). Ce double "spot" a par ailleurs été visualisé, de façon moins nette, sur le profil de la souche symbiotique de *Sitophilus oryzae* (Figure C.2.1.). Par analogie avec les résultats obtenus par Morioka et Ishikawa (1992) sur le puceron du pois, nous avons émis l'hypothèse que le deuxième "spot" observé sur le film (pHi plus acide) correspond à une forme phosphorylée de la protéine Hsp60 produite soit dans le cytoplasme des bactériocytes après exportation de la protéine, soit dans l'endocytobiote en condition *in vivo*. Des essais de phosphorylation *ex vivo*, ont donc été réalisés et ont permis de valider cette hypothèse (Figure C.2.11).

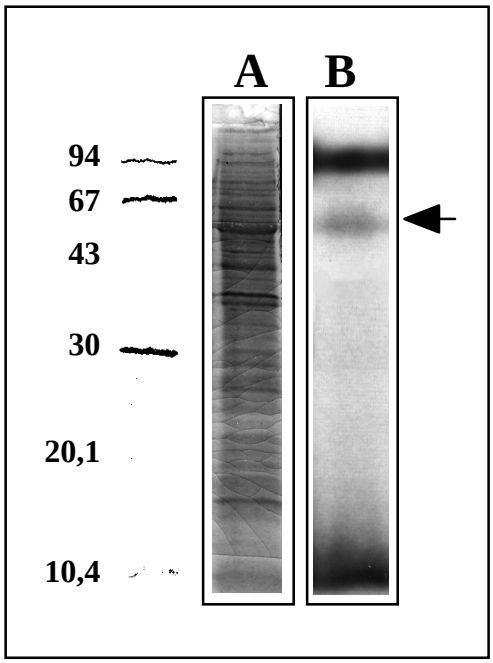


Figure C.2.11. : Phosphorylation des protéines synthétisées dans les bactériocytes. (A) : coloration au bleu de Coomassie ; (B) : autoradiographie ; la position de la protéine Hsp60 est repérée par une flèche sur la figure.

Le dernier point important de cette étude concerne l'abondance relative de la protéine Hsp60 par rapport aux autres protéines néosynthétisées. Tout se passe comme si le bactériome était capable d'induire sélectivement l'expression de la protéine Hsp60 (et peut-être celle d'une autre protéine de 30 kDa (pHi = 6,1) non identifiée). L'intégration des densités optiques des bandes d'électrophorèse monodirectionnelle montre, en effet, que cette protéine représente au moins 40 % des néosynthèses des bactériomes *ex vivo*.

Afin de vérifier cette hypothèse d'induction spécifique par le bactériome de l'expression de la protéine Hsp60 des endocytobiotes, nous avons quantifié par "Northern blot" le taux relatif d'ARNm *hsp60*, par rapport au taux d'ARNr 16S, dans les endocytobiotes libres et dans les bactériomes isolés. Une quantité relative plus importante d'ARNm *hsp60* a effectivement été mise en évidence dans les bactériomes. Cependant, ces résultats n'ont pas pu être validés car une dégradation importante de l'ARN des endocytobiotes libres a systématiquement été observée au cours de ces expériences (données non présentées).

Les résultats négatifs de "Northern blot" soulignent un aspect critique important de cette étude : le modèle "endocytobiotes *in vitro*" considéré est certainement un modèle biaisé. En effet, les endocytobiotes en conditions de survie sont capables de se mouvoir, de synthétiser des protéines et des ARN, mais ils ne sont pas capables de se diviser. Ainsi, l'importante dégradation des ARN observée dans nos expériences est peut-être liée aux dysfonctionnements de ces bactéries lorsqu'elles ne sont plus dans leur contexte intracellulaire. Les même critiques peuvent être

adressées au modèle *ex vivo*, puisque jusqu'à présent la culture des bactériocytes n'a pas été réalisée avec succès au laboratoire.

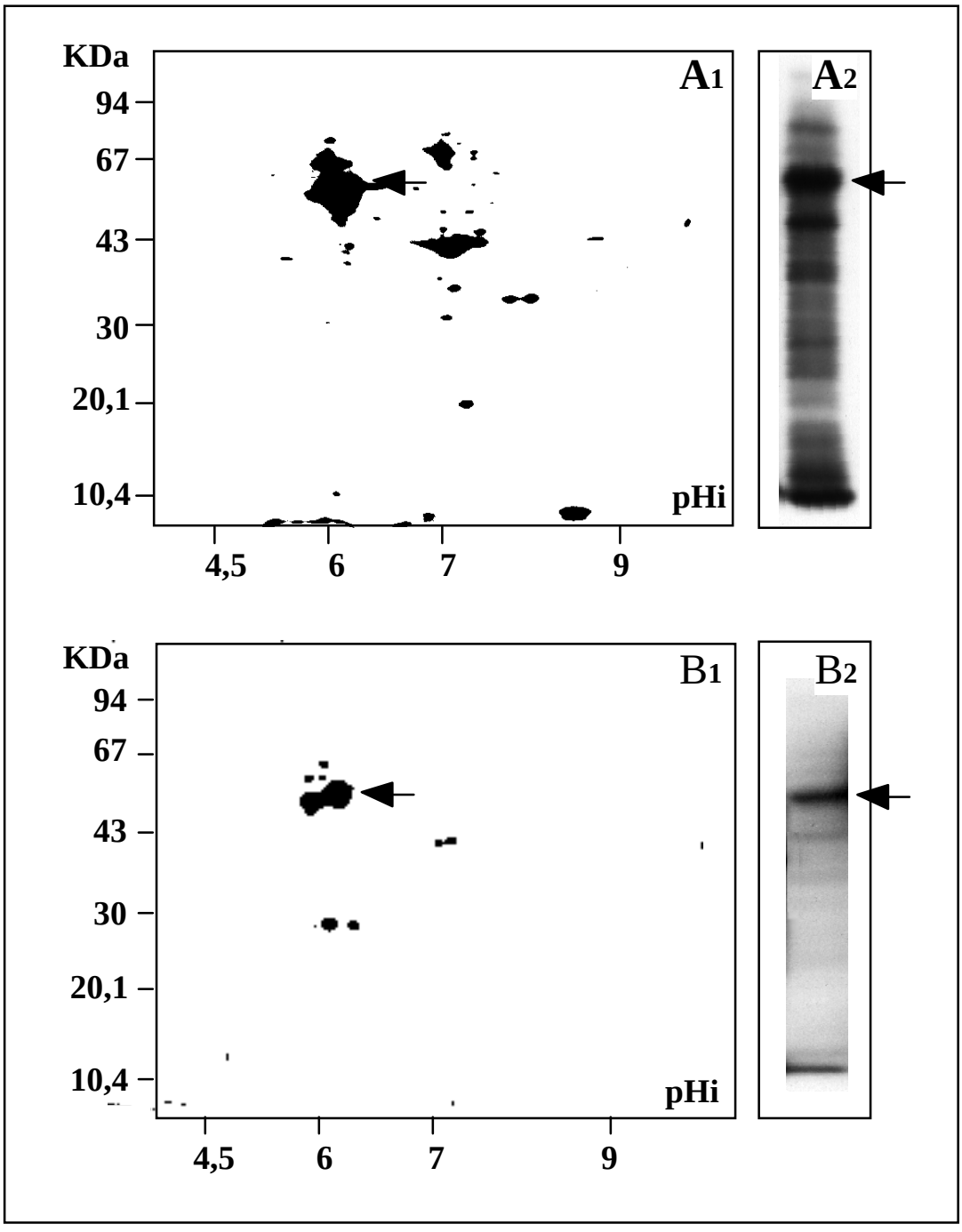


Figure C.2.12. Profils d'électrophorèse des protéines néosynthétisées *in vitro* (A : huit heures d'exposition du film d'autoradiographie) et *ex vivo* (B : 36 heures d'exposition) par les endocytobiotes de *Sitophilus oryzae* ; (A_1 et B_1) : électrophorèse bidimensionnelle ; (A_2 et B_2) : électrophorèse monodirectionnelle. Les quantités protéiques totales déposées sont identiques pour les quatre électrophorèses (50 μg) ; la position de la protéine Hsp60 est repérée par une flèche sur la figure.

C.2.2.4.2. Étude de l'effet d'un traitement thermique sur l'expression du gène *hsp60* des endocytobiotes des larves de *Sitophilus oryzae*

Nardon, en 1973, a mis en évidence l'influence d'un traitement thermique sur l'équilibre de la relation symbiotique chez *Sitophilus oryzae*. Cet auteur a en effet montré qu'un traitement de un mois à 35°C en atmosphère humide empêche totalement la transmission des endocytobiotes à la descendance. Dans ce travail, nous avons donc cherché à mesurer l'influence d'une élévation de la température d'élevage des larves sur l'expression du gène *hsp60* majoritairement exprimé dans les endocytobiotes de *Sitophilus oryzae*, ce gène étant probablement impliqué dans les mécanismes de contrôle de l'équilibre symbiotique.

Des larves de quatrième stade ont été extraites des grains de blé et placées, de cinq minutes à deux heures, dans des étuves humides à différentes températures. Le taux d'ARNm *hsp10* et *hsp60* a alors été mesuré par "Northern blot" en utilisant comme sonde un fragment *EcoR I* - *Xba I* de 2 kb issu du plasmide SymIII. Les densités optiques des bandes mesurées sur les films d'autoradiographie ont été ensuite normalisées par les intensités des bandes obtenues après hybridation du même blot avec une sonde d'ADN ribosomal 16S (plasmide Sfr23). Le gène *rrs* a été utilisé pour la normalisation car c'est un gène qui est supposé constitutif. La Figure C.2.13. présente les résultats d'autoradiographie et les courbes des densités optiques normalisées obtenues pour les différents transcrits.

A température normale d'élevage (27°C), deux bandes majeures d'environ 2,2 kb et 1,6 kb sont observées sur le film. Ces deux bandes pourraient correspondre, de par leur taille, à l'ARNm polycistronique *hsp10-hsp60* d'une part, et à l'ARNm monocistronique *hsp60* d'autre part. Elles sont issues soit de l'activation de deux promoteurs distincts, soit du clivage spécifique de l'ARNm polycistronique entre les régions *hsp10* et *hsp60*. Un tel clivage a été observé chez *Agrobacterium tumefaciens* au niveau d'une séquence inverse répétée (IR) située entre les gènes *hsp10* et *hsp60* (Segal et Ron, 1995). Cependant, chez les endocytobiotes de *Sitophilus oryzae*, cette hypothèse reste purement spéculative dans la mesure où d'une part, aucune IR n'a été repérée entre les gènes *hsp10* et *hsp60*, et d'autre part, l'ARNm monocistronique *hsp10* n'a jamais été détecté sur les blots.

L'augmentation de la température d'élevage à 32°C et à 38°C entraîne l'apparition sur l'autoradiogramme d'un troisième transcrit d'environ 1,8 kb. Ces résultats semblent indiquer que l'opéron *groE* des endocytobiotes de *Sitophilus oryzae* est régulé par deux ou trois promoteurs différents. Néanmoins l'existence d'un deuxième gène *hsp60* sur le chromosome des endocytobiotes pourrait également expliquer la présence de plusieurs ARNm sur l'autoradiogramme. Enfin, l'hypothèse de l'hybridation de la sonde avec le gène *hsp60* des *Wolbachia* ne peut pas être complètement exclue, même si des conditions de stringence forte ont été respectées dans les expériences de "Northern blot" (les membranes ont été lavées trois fois 15 minutes à 55°C dans un tampon 2X, 1X et 0,5X SSC). L'homologie entre la sonde SymIII et le gène *hsp60* de *Wolbachia* ne peut pas être estimée avec précision dans la mesure où

ce gène n'est pas séquencé chez cette bactérie. Il est à noter cependant qu'une homologie d'environ 65 % a été estimée entre le gène *hsp60* des endocytobiotes et les gènes *hsp60* de trois α-protéobactéries (*Agrobacterium tumefaciens*, *Brucella abortus* et *Rhizobium leguminosarum*). Pour éliminer définitivement cette hypothèse d'hybridation non spécifique, il serait intéressant de réaliser ces expériences sur une souche dépourvue de symbiotes principaux et contenant des *Wolbachia*.

Le principal résultat de cette étude concerne l'induction par la température de ces différents transcrits. En effet, le transcrit de 1,6 kb s'accumule de façon importante dans les larves de *Sitophilus oryzae* à la température de 38°C. La même observation peut être faite pour le transcrit de 1,8 kb dont l'expression est induite dès 32°C. Par contre le taux de transcrits de 2,2 kb reste relativement constant aux trois températures. Enfin, à 43°C, les larves meurent très rapidement et des dégradations importantes apparaissent sur les blots dès les 15 premières minutes du traitement (données non présentées). Au moins trois hypothèses, non exclusives, peuvent être émises pour expliquer l'ensemble de ces observations : (1) les deux promoteurs, générant les transcrits de 1,6 kb et 1,8 kb sont inductibles par la chaleur, contrairement au promoteur générant le transcrit de 2,2 kb ; (2) les transcrits de 1,6 kb et 1,8 kb, contrairement au transcrit de 2,2 kb, sont stabilisés dans la cellule lors de l'élévation de la température ; (3) le transcrit de 2,2 kb est induit par la chaleur mais il ne s'accumule pas dans la cellule, des phénomènes de maturation ("processing") pourraient être à l'origine de l'apparition des bandes de 1,6 kb et 1,8 kb sur l'autoradiogramme.

Par ailleurs, il faut garder à l'esprit que le taux de transcrits de 1,8 kb n'a augmenté que d'un facteur trois dans la cellule alors que des augmentations beaucoup plus importantes (et surtout beaucoup plus rapides) sont généralement observées chez les bactéries libres (*cf.* § A.5.2.). Il est donc possible, qu'à cause du stress intracellulaire, l'expression du gène *hsp60* des endocytobiotes soit déjà fortement induite dans les bactériocytes. Cette induction spécifique qui a d'ailleurs été observée *ex vivo* dans ce travail (§ C.2.2.4.1.), pourrait ainsi limiter l'influence de la température sur l'expression de ce gène.

Le clonage et le séquençage de la région située en amont du gène *hsp10* des endocytobiotes de *Sitophilus oryzae*, ainsi que des expériences d'extension d'amorces chez *Escherichia coli* seront d'un grand intérêt pour tenter de comprendre ces mécanismes de régulation.

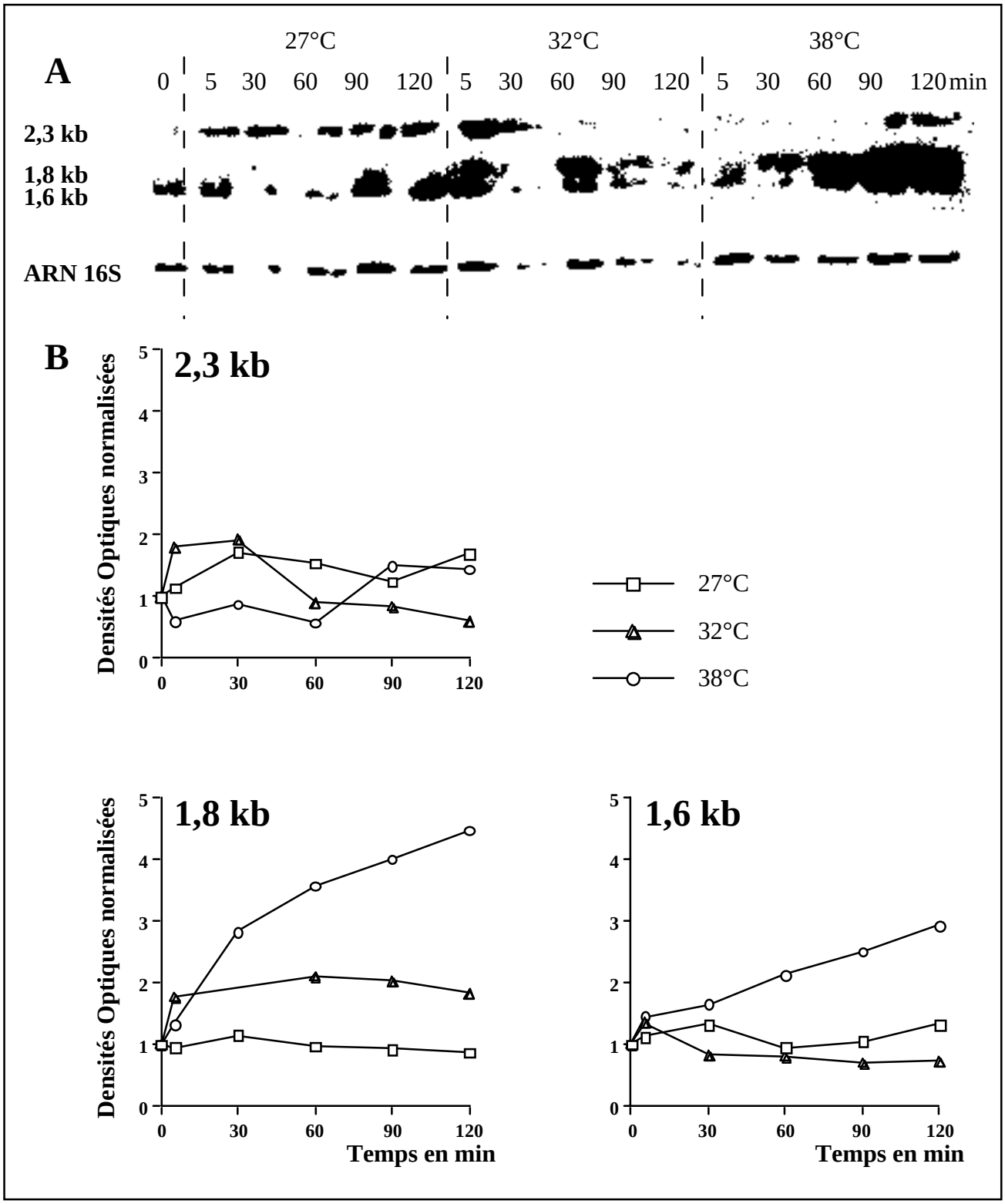


Figure C.2.13. : Analyse par “Northern blot” de l’expression de l’opéron *groE* des endocytobiotes de *Sitophilus oryzae* ; (A) : films d’autoradiographie obtenus après hybridation du blot avec les sondes SymIII (en haut) et Sfr23 (en bas) ; (B) : graphes des densités optiques normalisées (DO_{hsp60} / DO_{16S}) pour les trois transcrits observés.

C.2.3. Discussion

La comparaison des profils d'électrophorèse bidimensionnelle des souches symbiotique et aposymbiotique de *Sitophilus oryzae* et la visualisation des protéines n°1 et n°2 ont permis de montrer que l'expression du génome eucaryote hôte est modifiée par son environnement symbiotique. Nardon, en 1978, avait déjà émis cette hypothèse en montrant un effet d'incompatibilité nucléocytoplasmique entre les souches symbiotique et aposymbiotique de cet insecte. La symbiose chez *Sitophilus* se traduit essentiellement par un bilan de synthèse positif : les individus symbiotiques sont plus gros, plus vigoureux et plus féconds que les aposymbiotiques. Ces différences sont liées à la contribution des endocytobiotes aux voies du métabolisme énergétique de l'hôte. Il est donc probable que les protéines induites ou réprimées chez l'hôte (protéine n°1 et 2) ou chez le symbiote (protéine n°3 et 4) soient directement impliquées dans ces mécanismes d'interactions métaboliques.

Par ailleurs, la présence de deux protéines de choc thermique (Hsp10 et Hsp60) a été mise en évidence dans les endocytobiotes des trois espèces de *Sitophilus* des céréales. Ces protéines sont stockées en quantité importante à l'intérieur des bactériomes chez la larve et chez l'adulte. Ainsi, nous avons pu montrer par marquage radioactif des protéines néosynthétisées que la protéine Hsp60 des endocytobiotes de *Sitophilus oryzae* représente environ 40 % des néosynthèses des bactériomes. En comparaison, le taux de Hsp60 en condition de culture normale est de 1 à 2 % chez *Escherichia coli* et il peut atteindre 10 à 15 % en cas de stress thermique à 43°C (Langer et Neupert, 1991). Ces résultats laissent donc supposer que les endocytobiotes de *Sitophilus oryzae* dans la cellule eucaryote hôte subissent une forme de stress cellulaire importante. Chez le puceron du pois, des résultats très similaires ont été montrés par l'équipe japonaise du professeur Ishikawa (1989a). C'est ce qui a conduit ces chercheurs à attribuer le terme de "symbionine" à la protéine Hsp60 des endocytobiotes. Ils ont de plus montré que le contrôle de l'induction sélective de la protéine Hsp60 s'estompe avec l'âge des insectes hôtes. Cette observation semble montrer que le génome eucaryote lui-même, et non pas seulement les conditions intracellulaires (la limitation en nutriments par exemple), pourait être responsable de la régulation de ce gène procaryote.

Un autre aspect remarquable de cette étude provient du fait que la protéine Hsp60 semble être la seule protéine surexprimée par les endocytobiotes de *Sitophilus oryzae* dans les bactériocytes. En effet, chez *Escherichia coli*, une augmentation de la température de culture à 42°C induit l'expression de nombreux polypeptides et notamment celle de la protéine chaperon Hsp70 qui, comme la protéine Hsp60, est sous la dépendance d'un promoteur Pσ32 (Chuang et Blattner, 1993). Il est donc probable que, chez les endocytobiotes de *Sitophilus oryzae*, un promoteur spécifique de cette protéine soit responsable de son expression sélective. Il est à noter que chez les endocytobiotes de l'amibe, un promoteur spécifique et très actif régule l'activité du gène

hsp60 (Ahn *et al*., 1994). Selon les auteurs, ce promoteur pourrait correspondre à une adaptation des endocytobiotes aux conditions de vie intracellulaire.

Enfin, les expériences de "Northern blot" présentées dans ce travail montrent que l'augmentation de la température d'élevage des larves, qui peut être considérée comme une augmentation du stress intracellulaire pour l'endocytobiote, aboutit rapidement à l'accumulation de transcrits *hsp10* ou *hsp60* dans la cellule bactérienne.

L'ensemble de ces résultats nous amène alors à émettre un certain nombre d'hypothèses concernant le rôle de la protéine Hsp60 dans le symbiocosme. Chez les bactéries parasites intracellulaires, la protéine Hsp60 est vraisemblablement exprimée et utilisée pour la formation et l'excrétion des facteurs de virulence (*cf.* § A.5.3.1.). Dans ce type de "symbiose antagoniste", la notion de stress et d'agression est évidente. En effet, l'association aboutit nécessairement à la mort de l'hôte ou à l'élimination des parasites. Par contre, dans le cas de la symbiose mutualiste et plus précisément de l'endocytobiose intégrée, la surexpression de la protéine Hsp60 en réponse au "stress intracellulaire" est une notion beaucoup plus difficile à interpréter. La question principale étant : "qu'est-ce que représente véritablement le stress intracellulaire pour une bactérie qui cohabite avec son hôte depuis plusieurs millions d'années ?" Six hypothèses non exclusives, basées sur les résultats de ce travail et sur les données de la littérature, ont ainsi été formulées pour tenter de définir le rôle de cette protéine dans la symbiose chez le charançon *Sitophilus oryzae* :

(1) la protéine Hsp60 participe à la translocation membranaire et aux repliements des protéines hôtes importées à l'intérieur des endocytobiotes ;

(2) elle participe à la formation et à l'excrétion de facteurs de virulence qui permettent aux endocytobiotes de contourner la barrière immunitaire de l'hôte ;

(3) elle compense les dommages causés, sur la séquence d'ADN, par la reproduction asexuée des endocytobiotes en aidant le repliement des protéines ayant des structures tertiaires ou quaternaires altérées ;

(4) elle participe aux échanges énergétiques entre l'hôte et les endocytobiotes via ses propriétés de phosphorylation ;

(5) elle est excrétée dans le cytoplasme du bactériocyte et assure une fonction précise pour l'hôte.

(6) Enfin, l'hôte induit l'expression quasi élective de cette protéine afin de diminuer la virulence de la bactérie symbiotique (en limitant son potentiel global de synthèse) et évite ainsi l'envahissement.

Les trois premières hypothèses énoncées ci-dessus font appel aux propriétés de molécule chaperon de la protéine Hsp60 des endocytobiotes de *Sitophilus oryzae*. La complémentation des mutants GroE$^-$ par le gène *hsp60* des endocytobiotes n'a pas pu être vérifiée, néanmoins la très forte conservation de la séquence protéique de cette protéine laisse supposer qu'elle a gardé

son rôle de molécule chaperon dans la cellule bactérienne. Par contre, aucune preuve de l'importation de protéines hôtes à l'intérieur des endocytobiotes (hypothèse 1), de l'exportation de facteurs bactériens dans le cytoplasme des bactériocytes (hypothèse 2) ou de l'effet délétère de la reproduction asexuée sur l'ADN des endocytobiotes (hypothèse 3) ne peut être fournie pour le moment chez *Sitophilus oryzae*.

L'hypothèse 4 est basée sur les propriétés de phosphorylation *in vivo* de la protéine Hsp60 des endocytobiotes de *Sitophilus oryzae*. Cette hypothèse a été étudiée d'une façon plus précise chez le puceron du pois. Dans ce modèle, la protéine Hsp60 est capable *in vitro* de reformer du GTP et de l'ATP à partir du GDP et de l'ADP (Morioka *et al.*, 1993a). Mais aucune preuve de cette activité *in vivo* n'a été fournie pour le moment.

Enfin, les deux dernières hypothèses sont les seules qui d'un point de vue évolutif permettent d'expliquer pourquoi l'hôte aurait trouvé un avantage à s'emparer du contrôle de l'expression de ce gène bactérien. Néanmoins, la protéine Hsp60 ne semble pas sécrétée en quantité importante dans l'hémolymphe des charançons, elle est par contre peut-être sécrétée dans le cytoplasme du bactériome (hypothèse 5), mais sa fonction dans ce compartiment reste indéterminée. L'hypothèse du contrôle de la croissance de la population bactérienne est très difficile à tester expérimentalement. De plus, la conservation importante de la séquence protéique Hsp60 des endocytobiotes est contradictoire avec cette hypothèse. On peut, en effet, s'attendre à observer un nombre important de substitutions non conservatives à l'intérieur de la séquence du gène *hsp60*, si on suppose que la protéine traduite a plus ou moins perdu sa fonction de molécule chaperon dans la cellule.

PARTIE D

CONCLUSION ET PERSPECTIVES

D.1. CONCLUSION ET PERSPECTIVES

Le but de ce travail était l'étude à un niveau moléculaire de la structure du symbiocosme chez *Sitophilus oryzae* : la caractérisation de la bactérie symbiotique principale d'une part, et l'analyse de ses interactions avec l'hôte d'autre part.

Le séquençage de trois gènes des endocytobiotes de *Sitophilus oryzae* (*rrs*, *hsp10* et *hsp60*) a permis de montrer l'appartenance de cette bactérie au groupe des γ-protéobactéries et plus précisément à la famille des Entérobacteriaceae. Cette étude phylogénétique a finalement montré qu'*Erwinia herbicola* pourrait être un descendant direct de l'ancêtre des endocytobiotes du charançon. La taille du génome des endocytobiotes a été estimée par électrophorèse en champs pulsés à 3,0 Mb, c'est-à-dire environ 63 % de la taille du génome d'*Erwinia herbicola*. Il est probable que le génome de cette bactérie symbiotique ait subi des délétions (et des transferts) de gènes au cours de son évolution dans le cytoplasme de l'hôte. Cette hypothèse a été renforcée par la mise en évidence du faible nombre de gènes (deux copies) codant l'ARN ribosomal 23S sur le chromosome de cette bactérie. Le taux de C+G de l'ADN des endocytobiotes a été estimé globalement à 54 % par chromatographie liquide à haute performance. Le taux de C+G en troisième position de codon à l'intérieur du gène *hsp60*, ainsi que le taux de C+G au niveau du gène *rrs* ont également été déterminés. Sur la base de ces trois critères, il est apparu que la composition en C+G de l'ADN des endocytobiotes de *Sitophilus oryzae* est significativement plus élevée que celle des autres bactéries intracellulaires.

L'ensemble de ces résultats montre que la bactérie symbiotique principale de *Sitophilus oryzae* pourrait provenir d'une bactérie vivant sur les plantes ingérées par le charançon. L'intégration de cette bactérie dans les cellules de l'hôte s'est faite soit selon un mécanisme passif (par endocytose des bactéries du tube digestif), soit selon un mécanisme actif (par infestation totale de l'insecte). La faible pathogénicité d'*Erwinia herbicola* est un argument plutôt en faveur de la première hypothèse, même si dans ce cas, le scénario de la contamination des cellules germinales reste difficile à imaginer.

Enfin, l'âge de la divergence entre les endocytobiotes de *Sitophilus oryzae* et la bactérie libre la plus proche *Erwinia herbicola*, a été estimé à -270 millions d'années. Cette date ne correspond pas à la date de l'association symbiotique puisqu'à cette époque (fin du Carbonifère) apparaissaient seulement les premiers coléoptères (Figure D.1.1.). Une intégration datant d'environ -150 millions d'années (Crétacé inférieur) paraît plus probable dans la mesure où cette date correspond à l'apparition des plantes à fleurs et des différents insectes leur étant inféodées comme les Curculionoidea. Cette hypothèse est cohérente d'une part avec l'estimation de la divergence entre les endocytobiotes des deux espèces jumelles de *Sitophilus oryzae* et *Sitophilus zeamais* (120 millions d'années), et d'autre part avec les travaux de Buchner (1965) qui décrit des endocytobiotes dans au moins trois familles de

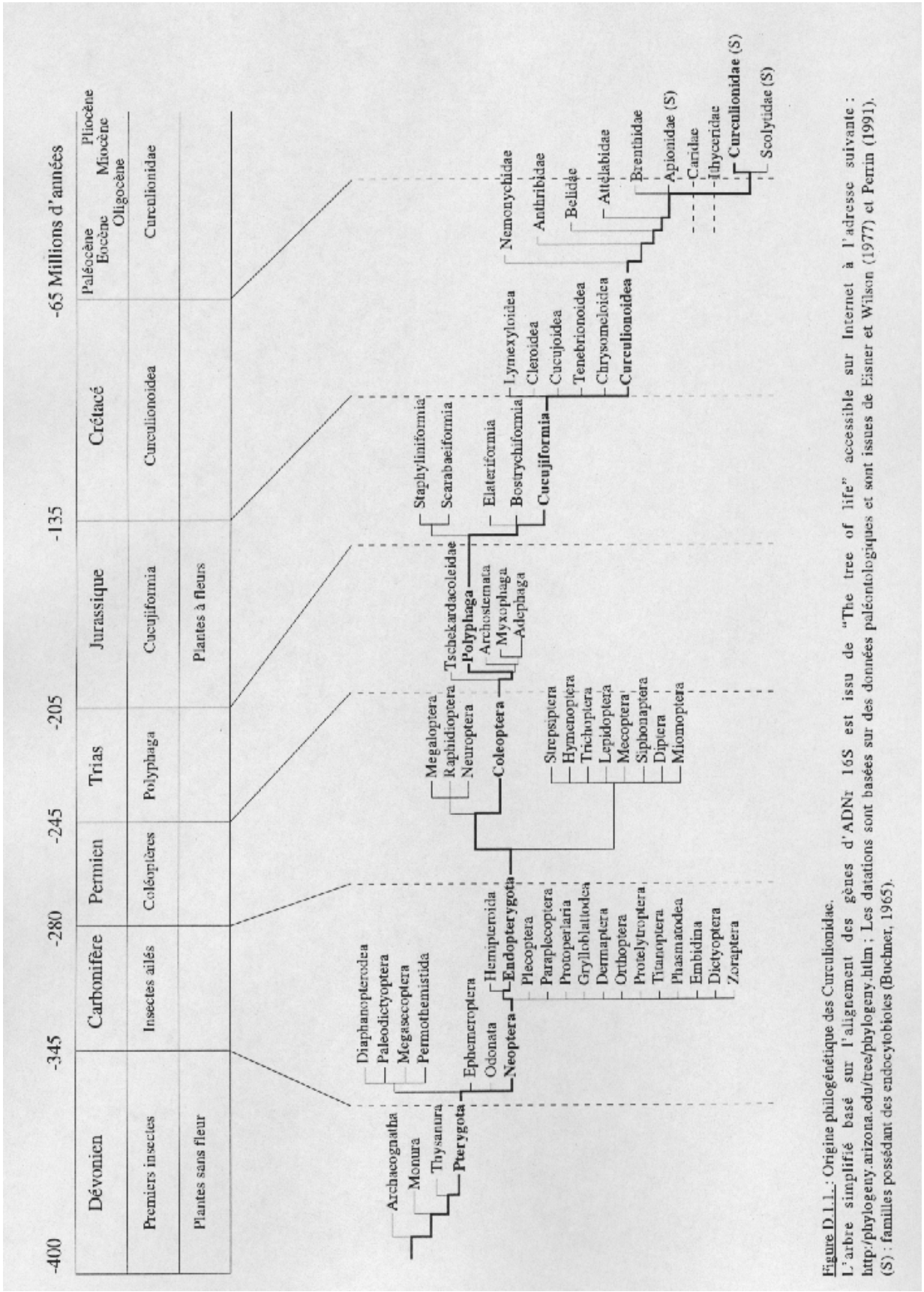


Figure D.1.1. : Origine philogénétique des Curculionidae.
L'arbre simplifié basé sur l'alignement des gènes d'ADNr 16S est issu de "The tree of life" accessible sur Internet à l'adresse suivante : http://phylogeny.arizona.edu/tree/phylogeny.html ; Les datations sont basées sur des données paléontologiques et sont issues de Eisner et Wilson (1977) et Perrin (1991). (S) : familles possédant des endocytobioles (Buchner, 1965).

Curculionoidea (les Curculionidae, les Scolytidae et les Apionidae). Il est à noter que la symbiose du puceron est beaucoup plus ancienne que celle du charançon (200-250 millions d'années). Les résultats concernant la taille du génome et le taux de C+G de l'ADN des endocytobiotes de *Sitophilus oryzae* confortent cette hypothèse.

Des expériences d'immunomarquage ont permis de montrer la présence des protéines Hsp10 et Hsp60 à l'intérieur des endocytobiotes des trois espèces de *Sitophilus* des céréales. Chez *Sitophilus oryzae,* nous avons pu montrer que la protéine Hsp60 est sélectivement exprimée par les endocytobiotes lorsqu'ils sont à l'intérieur des bactériocytes. En effet, des expériences de marquage radioactif des néosynthèses ont révélé que 40 % des néosynthèses des bactériomes isolés correspondent à cette protéine. Enfin, des expériences de "Northern blot" ont montré qu'au moins deux transcrits différents d'ARNm s'accumulent en quantité importante dans les larves symbiotiques en cas de traitement thermique à 38°C. Cette étude sur la protéine Hsp60 des endocytobiotes de *Sitophilus oryzae* nous a finalement amené à émettre plusieurs hypothèses sur son rôle dans la relation symbiotique. Ces hypothèses peuvent être résumées ainsi : "la protéine Hsp60 pourrait participer au repliement des protéines néosynthétisées, importées ou détériorées dans les endocytobiotes (ou dans le cytoplasme des bactériocytes) et, en contrôlant l'expression de son gène, l'hôte pourrait peut-être contrôler l'effectif de sa population d'endocytobiotes".

Ce travail constitue la première étude réalisée au laboratoire, à un niveau moléculaire, sur le symbiocosme chez *Sitophilus oryzae*. Il nous a permis d'aborder des problèmes très diversifiés dans les domaines de l'évolution moléculaire, de la biochimie et de la biologie moléculaire, et nous espérons qu'il permettra l'initiation d'autres travaux sur la symbiose chez le charançon.

Ainsi, dans la continuation directe de ce travail, l'étude de la régulation de l'opéron *groE* des endocytobiotes de *Sitophilus oryzae* est envisageable. Pour cela, le nombre de gènes *hsp60* et *hsp10* sur le chromosome des endocytobiotes devra être estimé par "Southern blot" grâce à la sonde SymIII. Le clonage, chez *Escherichia coli,* de ces gènes avec leurs régions régulatrices devra alors être réalisé. L'étude de la régulation de l'opéron *groE* pourra ensuite être entreprise d'une part par la technique d'extension d'amorce, pour tenter de mettre en évidence les différents promoteurs, et d'autre part par des expériences de délétions dans les régions régulatrices de ces gènes. Enfin, la mise en évidence d'éléments régulateurs, par la technique de retard sur gels, pourra être envisagée. Parallèlement à ce travail, la surexpression de la protéine Hsp60 des endocytobiotes de *Sitophilus oryzae,* par insertion de son gène dans un vecteur d'expression, devrait permettre sa caractérisation biochimique *in vitro* (propriétés d'ATPase, de phosphorylase et de protéine chaperon). Ces propriétés devront être comparées à celles de la protéine GroEL d'*Escherichia coli*.

Le deuxième travail qui pourrait être entrepris concerne la caractérisation des protéines n°1 et n°2. Leur localisation précise sur les gels d'électrophorèse bidimensionnelle permettra leur purification en quantité suffisante pour fabriquer des anticorps polyclonaux. Ces anticorps

pourront alors servir de marqueurs pour une purification en quantité plus importante par chromatographie liquide. Le séquençage des parties N-terminales de ces protéines purifiées permettra la fabrication de sondes utilisables ensuite pour le clonage des gènes correspondants. L'étude de l'expression et de la régulation de ces gènes pourra ensuite être envisagée en utilisant l'ensemble des techniques de biologie moléculaire disponibles au laboratoire.

Enfin, la dernière perspective que nous avons envisagée est axée sur l'estimation de l'âge de la symbiose chez *Sitophilus oryzae*. Pour cela, il faudra caractériser tout d'abord un maximum d'espèces d'hôtes du genre *Sitophilus* ainsi que quelques espèces de Curculionidae d'autres genres (par le séquençage d'un gène mitochondrial par exemple). Il faudra ensuite caractériser les différents endocytobiotes correspondant à ces différentes espèces d'hôtes par le séquençage des gènes *hsp10* et *hsp60* ou d'un gène plus variable comme le gène ftsZ. La mise en parallèle des deux arbres phylogénétiques obtenus devrait permettre d'estimer l'âge de l'association. Un arbre phylogénétique des *Wolbachia* (basé sur le gène ftsZ) serait également intéressant pour estimer l'âge de cette deuxième association. Des travaux ont déjà été réalisés en ce sens au laboratoire par A. Heddi.

J'espère que ce travail aura contribué, au moins dans une certaine mesure, à une meilleure compréhension des mécanismes d'interactions entre les partenaires du symbiocosme chez *Sitophilus oryzae*. Il faut souligner à ce sujet que le développement de la biologie moléculaire au laboratoire a révélé un degré de complexité très important de ce modèle. En effet, quatre ou cinq génomes au minimum interagissent dans le symbiocosme chez *Sitophilus oryzae* : le génome nucléaire, le génome mitochondrial, les génomes des endocytobiotes primaires (et peut-être secondaires) et le génome des *Wolbachia* (Figure D.1.2.). Ainsi, l'hypothèse de Buchner (1965) qui considérait la symbiose comme la simple juxtaposition des différents génomes a été reformulée en termes d'interactions entre les génomes. Pour le moment, les interactions noyau-mitochondries, noyau-symbiotes principaux et mitochondries-symbiotes principaux ont été étudiées. Mais toutes les autres combinaisons, et notament les interactions noyau-*Wolbachia* ou symbiotes principaux-*Wolbachia* sont totalement inconnues. Heureusement pour les chercheurs, et c'est à mon avis tout l'intérêt du modèle *Sitophilus*, des souches entièrement aposymbiotiques (sans endocytobiotes principaux ni *Wolbachia*) et des souches possédant uniquement l'une ou l'autre de ces bactéries symbiotiques ont été obtenues au laboratoire. Des études physiologiques et moléculaires sont maintenant développées pour tenter de définir précisément le rôle des différents endocytobiotes dans le maintien de l'équilibre du symbiocosme. A plus long terme, si les recherches entreprises sur la recontamination des individus aposymbiotiques et sur la co-culture des endocytobiotes avec leurs bactériocytes aboutissent avec succès, le modèle *Sitophilus* pourrait alors devenir l'un des modèles les plus complets et les plus souples d'étude de la symbiose intracellulaire. C'est bien sûr tout ce que je souhaite aux chercheurs du laboratoire de biologie appliquée de l'INSA.

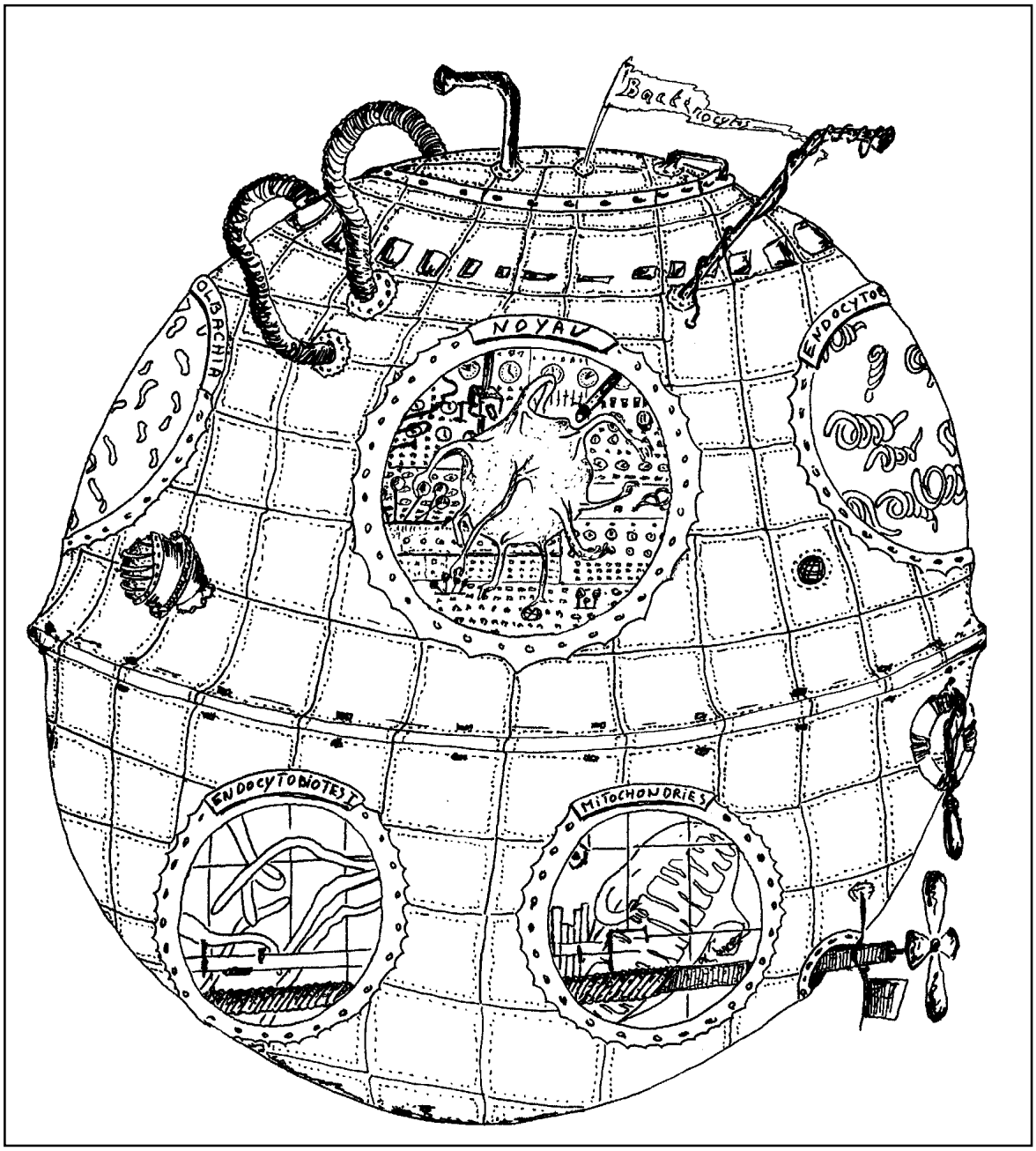


Figure D1.2. : Le bactériocyte est une cellule complexe dans laquelle interagissent quatre ou cinq génomes : le génome nucléaire, le génome mitochondrial, les génomes des deux endocytobiotes principaux et le génome des *Wolbachia*.

PARTIE E

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

Abshire, K.A. et Neidhardt, F.C. Analysis of proteins synthesized by *Salmonella typhimurium* during growth within a host macrophage. *J. Bacteriol.*, 1993, Vol. 175, p. 3734-3743.

Ahn, T.I., Hyon, K.L., Kwak, I.H. et Jéon, K.W. Nucleotide sequence and temperature-dependent expression of *xgroEL* gene isolated from symbiotic bacteria of *Amoeba proteus. Endocytobiosis and cell. res.*, 1991, Vol. 8, p. 33-44.

Ahn, T.I. et Jéon, K.W. Characteristics of a heat-shock gene of symbiotic bacteria in *Amoeba proteus*. *Endocytobiology V.* Edited by S. Sato, M. Ishida, H. Ishikawa. Tübingen : Tübingen university press., 1993, p. 493-498.

Ahn, T.I., Lim, S.T., Leeu, H.K., Lee, J.E. et Jéon, K.W. A novel strong promoter of the operon of symbiotic bacteria in *Amoeba proteus*. *Gene*, 1994, Vol. 128, p. 43-49.

Aksoy, S. Molecular analysis of the endosymbionts of tsetse flies: 16S rDNA locus and over-expression of a chaperonin. *Insect Mol. Biol*., 1995, Vol. 4, p. 23-29.

Alleman, A.R., Kamper, S.M., Viseshakul, N. et Barbet, A.F. Analysis of the *Anaplasma marginale* genome by pulsed-field electrophoresis. *J. Gen. Microbiol.*, 1993, Vol. 139, N°10, p. 2439-2444.

Anfinsen, C.B. Principles that govern the folding of protein chains. *Science*, 1973, Vol. 181, p. 223-230.

Azem, A., Kessel, M. et Goloubinoff, P. Characterization of a functional GroEL(14)GroES(7)(2) chaperonin hetero-oligomer. *Science*, 1994, Vol. 265, N°5172, p. 653-656.

Babst, M., Hennecke, H. et Fisher, H.M. Two different mechanisms are involved in the heat-shock regulation of chaperonin gene expression in *Bradyrhizobium japonicum*. *Mol. Microbiol.*, 1996, Vol. 19, N°4, p. 827-839.

Baird, P.N., Hall, L.M. et Coates, A.R. Cloning and sequencing analysis of the 10 kDa antigen gene of *Mycobacterium tuberculosis*. *J. Gen. Microb.*, 1989, Vol. 135, p. 931-939.

Bairoch, A. et Boeckmann, B. The SWISS-PROT protein sequence data bank: current status;. *Nucleic. Acids Res*., 1994, Vol. 22, p. 3578-3580.

Bartz, S.R., Pauza, C.D., Ivanyi, J., Jindal, S., Welch, W.J. et Malkovsky, M. An Hsp60 related protein is associated with purified HIV and SIV. *J. Med. Primatol.*, 1994, Vol. 23, N°2-3, p. 151-154.

Baumann, P., Baumann, L. et Clark, M.A. Levels of *Buchnera aphidicola* chaperonin GroEL during growth of the aphid *Schizaphis graminum*. *Current Microbiology*, 1996, Vol. 32, p. 279-285.

Baumann, P., Baumann, L., Lai, C. et Rouhbakhsh, D. Genetics, Physiology, and evolutionary relationships of the genus *Buchnera*: Intracellular symbionts of aphids. *Annu. Rev. Microbiol.*, 1995, Vol. 49, p. 55-94.

Beckage, N.E., Templeton, T.J., Nielson, B.D., Cook, D.J. et Stoltz, D.B. Parasitism-induced hemolymph polypeptides in *Manducta sexta* (L.) larvae parasitized by the braconid wasp *Cortesia congregata* (Say). *Insect Biochem.*, 1987, Vol. 17, p. 439-455.

Benson, D., Lipman, D.J. et Ostell, J. GenBank. *Nucleic. Acids Res.*, 1993, Vol. 21, p. 2963-2965.

Bercovier, H., Kafri, O. et Sela, S. Mycobacteria possess a surprisingly small number of ribosomal RNA genes in relation to the size of their genome. *Biophys. Res. Commun.*, 1986, Vol. 136, p. 1136-1141.

Bernardi, G. The isochore organization of the human genome. *Ann. Rev. Genet.*, 1989, Vol. 23, p. 637-661.

Bernardi, G. et Bernardi, G. Compositional properties of nuclear genes from cold-blooded vertebrates. *J. Mol. Evol*., 1991, Vol. 33, p. 57-67.

Bernardi, G., Mouchiroud, D., Gautier, C. et Bernardi, G. Compositional patterns in vertebrate genomes: conservation and change in evolution. *J. Mol. Evol.*, 1988, Vol. 28, p. 7-18.

Blaszczak, A., Zylicz, M., Georgopoulos, C. et Liberek, K. Both ambient temperature and the DnaK chaperone machine modulate the heat shock response in *Escherichia coli* by regulating the switch between sigma(70) and sigma(32) factors assembled with RNA polymerase. *EMBO J.,* 1995, Vol. 14, N°20, p. 5085-5093.

Block, R.J. et Henry, S.M. Metabolism of the sulphur amino-acids and of sulphate in *Blattella germanica*. *Nature*, 1961, Vol. 191, p. 392-393.

Blum, H., Beier, H. et Gross, J.H. Improved silver staining of plant proteins, RNA and DNA in acrylamide gels. *Electrophoresis*, 1987, Vol. 8, p. 93-99.

Bochkareva, E.S., Lissin, N.M. et Girshovich, A.S. Transient association of newly synthesized unfolded proteins with the heat-shock GroEL protein. *Nature*, 1988, Vol. 337, p. 254-257.

Bonnot, G. Les interactions métaboliques au cours de la symbiose. *Bulletin d'information des Zoologistes de l'INRA.* Edited by Riba G. Guyancourt, 1996, p. 37-46.

Braig, K., Otwinowski, Z., Hegde, R., Boisvert, D.C., Joachimiak, A., Horwich, A.L. et Sigler, P.B. The crystal structure of the bacterial chaperonin GroEL at 2.8 angstroms. *Nature*, 1994, Vol. 371, N°6498, p. 578-586.

Breeuwer, J.A.J. et Werren, J.H. Microorganisms associated with chromosome destruction and reproductive isolation between two insect species. *Nature*, 1990, Vol. 346, p. 558-560.

Brooks, M.A. et Richards, A.G. Intracellular symbiosis in cockroaches. II - Mitotic division of mycetocytes. *Science*, 1955, Vol. 122, p. 242.

Buchner, J. Supervising the fold: functional principles of molecular chaperones. *FASEB J.*, 1996, Vol. 10, N°1, p. 10-19.

Buchner, P. *Endosymbiose der Tiere mit pflanzlichen Mikroorganismen.* Stuttgart : Verlag Birkhäuser Basel, 1953, 771 p.

Buchner, P. *Endosymbiosis of animals with plant microorganisms*. New York : Interscience, 1965. 909p.

Bukau, B. Regulation of the *Escherichia coli* heat shock response. *Mol. Microbiol.*, 1993, Vol. 9, p. 671-680.

Campbell, B.C., Bragg, T.S. et Turner, C.E. Phylogeny of symbiotic bacteria of four weevil species (Coleoptera : Curculionidae) based on analysis of 16S ribosomal DNA. *Insect Biochem.*, 1992, Vol. 22, N°5, p. 415-421.

Chandrasekhar, G.N., Tilly, K., Woolford, C., Hendrix, R. et Georgopoulos, C. Purification and properties of the GroES morphogenetic protein of *Escherichia coli*., *J. Biol. Chem.*, 1986, Vol. 261, N°26, p. 12414-12419.

Chattoraj, D.K. Role of molecular chaperones in the initiation of plasmid DNA replication. *Genetic Engineering*, 1995, Vol. 17, p. 81-97.

Chen, S., Roseman, A.M., Hunter, A.S., Wood, S.P., Burston, S.G., Ranson, N.A., Clarke, A.R. et Saibil, H.R. Location of a folding protein and shape changes in GroEL-GroES complexes imaged by cryo-electron microscopy. *Nature*, 1994, Vol. 371, p. 261-264.

Chuang, C. et Blattner, F. Characterization of twenty-six new heat shock genes of *E. coli*. *J. Bact.*, 1993, Vol. 175, p. 5242-5252.

Colston, A., Mcconnell, I. et Bujdoso, R. Cloning and expression in *Escherichia coli* of DNA encoding a 60 kDa stress protein of *Mycobacterium paratuberculosis*, the causative agent of Johne's disease. *Microbiology-UK*, 1994, Vol. 140, N°12, p. 3329-3336.

Conway de Macario, E., Dugan, C.B. et Macario, A.J.L. Identification of a grpE heat-shock gene homolog in the archaeon *Methanosarcina mazei*. *J. Mol. Biol.*, 1994, Vol. 240, N°1, p. 95-101.

Conway, N. et Capuzzo, J.M.D. Incorporation and utilization of bacterial lipids in the *Solemya velum* symbiosis. *Marine Biology*, 1991, Vol. 108, p. 277-291.

Cook, D.I., Stoltz, D.B. et Vinson, S.B. Induction of a new haemolymph glycoprotein in larvae of permissive hosts parasitized by *Campoletis sonorensis*. *Insect Biochem.*, 1994, Vol. 14, p. 50-55.

Crow, J.F. Advantages of sexual reproduction. *Dev. Genet.*, 1994, Vol. 15, p. 205-213.

Crozier, R.H. et Crozier, Y.C. The mitochondrial genome of the honeybee *Apis mellifera* : complete sequence and genome organisation. *Genetics*, 1993, Vol. 113, p. 97-117.

Dasch, G.A., Weiss, E. et Chang, K.P. Endosymbionts of insects. *Bergey's manuel of systematic bacteriology*, Baltimore: Williams & Wilkins, 1989, Vol. 4. p. 811-833.

Davidson, E.W., Segura, B.J., Steele, T. et Hendrix, D.L. Microorganisms influence the composition of honeydew produced by the silverleaf whitefly, *Bemisia argentifolii*. *J. Insect Physiol.*, 1994, Vol. 40, N°12, p. 1069-1076.

De Bary, H.A. De la symbiose. *Revue Internationale des Sciences*, 1879, Vol. 3, p. 301-309.

Delobel, B. et Grenier, A.M. Effect of non-cereal and tamarind pod weevil (Coleoptera : Curculionidae). *J. stored prod. Res.*, 1992, Vol. 29, N°1, p. 7-14.

Delobel, B., Rahbé, Y., Nardon, C., Guillaud, J. et Nardon, P. Biochemical and cytological survey of tyrosine storage proteins in Coleoptera : diversity of strategies. *Insect Biochem. Molec. Biol.*, 1993, Vol. 23, N°3, p. 355-365.

Durand, R. A new class of proteins - The molecular chaperones. *Medecine/Sciences*, 1991, Vol. 7, p. 496-499.

Ehrhardt, P. Untersuchungen zur Stoffwechselphysiologie von *Megoura viciae* Buckt., einer phloemsaugenden aphide. *Z. vergl. Physiol.*, 1962, Vol. 46, p. 169-211.

Ehrhardt, P. Der vitaminbedarf einer siebröhrensaugenden aphide, *Neomyzus circumflexus* Buckt (Homoptera, Insecta). *Z. vergl. Physiol.*, 1968, Vol. 60, p. 416-426.

Eisner, T. et Wilson, E.O. *The insects*. San Fransisco : W.H. Freeman and Company, 1977, 334 p.

Ellis, R.J. Proteins as molecular chaperones. *Nature*, 1987, Vol. 328, p. 378-379.

Ellis, R.J. Molecular chaperones - The plant connection. *Science*, 1990, Vol. 250, p. 954-959.

Ellis, R.J. et Van der Vies, S.M. Molecular chaperones. *Annu. Rev. Biochem.*, 1991, Vol. 60, p. 321-347.

Fayet, O., Louarn, J.M. et Georgopoulos C. Suppression of the *Escherichia coli* dnaA46 mutation by amplification of the *groES* and *groEL* genes. *Mol. Gen. Genet.*, 1986, Vol. 202, p. 435-445.

Fayet, O., Ziegelhoffer, T. et Georgopoulos, C. The *groES* and *groEL* heat shock gene products of *Escherichia coli* are essential for bacterial growth at all temperatures. *J. Bacteriol.*, 1989, Vol. 171, p. 1379-1385.

Fayet, O., Ziegelhoffer, T. et Georgopoulos, C. Sequence analysis and phenotypic characterization of *groEL* mutations that block lambda and T4 bacteriophage growth. *J. Bacteriol.*, 1993, Vol. 175, p. 1134-1143.

Febvay, G., Liadouze, I., Guillaud, J., et Bonnot, G. Analysis of energetic amino acid metabolism in *Acyrthosiphon pisum*: a multidimensional approach to amino acid metabolism in aphids. *J. Insect Biochem. Physiol.*, 1995, Vol. 29, p. 45-69.

Fenton, W.A., Kashi, Y., Furtak, K. et Horwich, A.I. Residues in chaperonin GroEL required for polypeptide binding and release. *Nature*, 1994, Vol. 371, p. 614-619.

Fiala-Medioni, A. Synthèse sur les adaptations structurales liées à la nutrition des mollusques bivalves des sources hydrothermales profondes. *Oceanologica Acta*, 1988, Vol. 4, p. 173-180.

Filichkin, S.A., Brumfield, S., Filichkin, T.P. et Young, M.J. *In vitro* interactions of the aphid endosymbiotic SymL chaperonin with Barley yellow dwarf virus. *J. Virology*, 1997, Vol. 71, N°1, p. 569-577.

Fischer, H.M., Babst, M., Kaspar, T., Acuna, G., Arigoni, F. et Hennecke, H. One member of a *groESL*-Like chaperonin multigene family in *Bradyrhizobium Japonicum* is co-regulated with symbiotic nitrogen fixation genes. *EMBO J.*, 1993, Vol. 12, N°7, p. 2901-2912.

Fleischmann, R.D., Adams, M.D., White, O., Clayton, R.A., Kirkness, E.F., Kerlavage, A.R., Bult, C.J., Tomb, J.F., Dougherty, B.A. et Merrick, J.M. Whole-genome random sequencing and assembly of *Haemophilus influenzae* Rd. *Science*, 1995, Vol. 269, p. 496-512.

Frank, S.A. The origin of synergistic symbiosis. *J. Theor. Biol.*, 1995, Vol. 176, p. 403-410.

Fricke, H.W. *Symbiosis, Symposia of the Society for experimental biology.* Cambridge : Cambridge University Press, 1975. The role of behaviour in marine symbiotic animals, p. 581-593.

Frutos, R., Pages, M., Bellis, M., Roizes, G. et Bergoin, M. Pulsed-field gel electrophoresis determination of the genome size of obligate intracellular bacteria belonging to the genera *Chlamydia*, *Rickettsiella* and *Porochlamydia*. *J. Bacteriol.*, 1989, Vol. 171, p. 4511-4513.

Galtier, N. et Lobry, J.R. Relationships between genomic G+C content, RNA secondary structures, and optimal growth temperature in prokaryotes. *J. Mol. Evol.*, 1997, Vol. in press.

Gamer, J., Multhaup, G., Tomoyasu, T., Mccarty, J.S., Rudiger, S., Schonfeld, H.J., Schirra, C., Bujard, H. et Bukau, B. A cycle of binding and release of the DnaK, DnaJ and GrpE chaperones regulates activity of the *Escherichia coli* heat shock transcription factor sigma(32). *EMBO J.*, 1996, Vol. 15, N°3, p. 607-617.

Gasnier-Fauchet, F. *Etude du rôle des bactéries symbiotiques dans le métabolisme protéique de leur hôte* Sitophilus oryzae *(Coléoptère, Curculionidae)*. Thèse : Sci. : Institut National des Sciences Appliquées de Lyon, 1985, 130 p.

Gasnier-Fauchet, F. et Nardon, P. Comparison of sarcosine and methionine sulfoxide levels in symbiotic larvae of two sibling species, *Sitophilus oryzae* L. and *S. zeamais* Mots. (Coleoptera : Curculionidae). *Insect Biochem.*, 1987, Vol. 17, N°1, p. 17-20.

Gatenby, A.A. et Viitanen, P.V. Structural and functional aspects of chaperonin-mediated protein folding. *Annu. Rev. Plant. Physiol.*, 1994, Vol. 45, p. 469-491.

Gehrke, C., McCune, R.A., Gama-Sosa, M., Ehrlich, M. et Kuo, K.C. Quantitative reverse-phase high-performance liquid chromatography of major and modified nucleosides in DNA. *J. Chrom.*, 1984, Vol. 301, p. 199-219.

Georgopoulos, C.P., Hendrix, R.W., Casjens, S.R. et Kaiser, A.D. Host participation in bacteriophage lambda head assembly. *J. Mol. Biol.*, 1973, Vol. 76, p. 45-60.

Gething, M.J. Molecular chaperones: individualists or groupies? *Current Opinion Cell. Biol.*, 1991, Vol. 3, p. 610-614.

Goloubinoff, P., Gatenby, A.A. et Lorimer, G.H. GroE heat-shock proteins promote assembly of foreign prokaryotic ribulose biphosphate carboxylase in *Escherichia coli*. *Nature*, 1989, Vol. 337, p. 44-47.

Gouy, M., Gautier, C., Attimonelli, M., Lanave, C. et DiPaola, G. ACNUC--a portable retrieval system for nucleic acid sequence databases: logical and physical designs and usage. *Comput. Appl. Biosci.*, 1985, Vol. 1, p. 167-172.

Govezensky, D., Bochkareva, E.S., Zamir, A. et Girshovich, A.S. Chaperonins as potential gene regulatory factors - *in vitro* interaction and solubilization of NifA, the nif transcriptional activator, with GroEL. *J Biol. Chem.*, 1994, Vol. 269, N°19, p. 14003-14006.

Grain, J. Le métabolisme des Ciliés du rumen. *Ann. Biol.*, 1967, Vol. 2, p. 2-41.

Grassé, P.P. et Noirot, C. L'évolution de la symbiose chez les Isoptères. *Experientia*, 1959, Vol. 15, p. 365-372.

Gray, W.M. The evolutionary origins of organelles. *Trends Gen.*, 1989, Vol. 5, N°9, p. 294-299.

Gray, W.M. Origin and evolution of organelle genomes. *Curr. Opin. Genet. Dev.*, 1993, Vol. 3, p. 884-890.

Grenier, A.M., Nardon, C. et Nardon, P. The role of symbiotes in flight activity of *Sitophilus* weevils. *Entomol. exp. appl.*, 1994, Vol. 70, p. 201-208.

Grenier, A.M., Nardon, P. et Bonnot, G. Importance de la symbiose dans la croissance des populations de *Sitophilus oryzae* L. (Coléoptère, Curculionide). Etude théorique et expérimentale. *Acta Oecologica*, 1986, Vol. 7, N°1, p. 93-110.

Gupta, R.S. Evolution of the chaperonin families (Hsp60, Hsp10 and Tcp-1) of proteins and the origin of eukaryotic cells. *Mol. Microbiol.*, 1995, Vol. 15, N°1, p. 1-11.

Gupta, R.S., Picketts, D.J. et Ahmad, S. A novel ubiquitous protein chaperonin supports the endosymbiotic origin of mitochondrion and plant chloroplast. *Biochem. biophys. Res. Comm.*, 1989, Vol. 163, N°2, p. 780-787.

Hara, E. et Ishikawa, H. Purification and partial characterization of symbionin, an aphid endosymbiont-specific protein. *Insect Biochem.*, 1990, Vol. 20, p. 421-427.

Harada, H., Oyaizu, H. et Ishikawa, H. A consideration about the origin of aphid intracellular symbiont in connection with gut bacterial flora. *J. Gen. Appl. Microbiol. Tokyo*, 1996, Vol. 42, N°1, p. 17-26.

Harris, J.R., Pluckthun, A. et Zahn, R. Transmission electron microscopy of GroEL, GroES, and the symmetrical GroEL/ES complex. *J. Struct. Biol.*, 1994, Vol. 112, N°3, p. 216-230.

Harris, J.R., Zahn, R. et Pluckthun, A. Electron microscopy of the GroEL-GroES filament. *J. Struct. Biol.*, 1995, Vol. 115, N°1, p. 68-77.

Hartlt, F.U., Hlodan, R. et Langer, T. Molecular chaperones in protein folding : the art of avoiding sticky situations. *Trends Biochem. Sci.*, 1994, Vol. 19, p. 20-25.

Hayes, S.A. et Dice, J.F. Roles of molecular chaperones in protein degradation. *J. Cell. Biol*., 1996, Vol. 132, N°3, p. 255-258.

Haygood, M.G. et Distel, D.L. Bioluminescent symbionts of flashlight fishes and deep-sea anglefishes form unique lineages related to the genus *Vibrio*. *Nature*, 1993, Vol. 363, p. 154-156.

Heddi, A. *Etude chez* Sitophilus oryzae *(Coléoptère, Curculionidae) de l'influence des bactéries symbiotiques sur le métabolisme énergétique mitochondrial.* Thèse : Sci. : Institut National des Sciences Appliquées de Lyon, 1990, 151p.

Heddi, A., Lefebvre, F. et Nardon, P. The influence of symbiosis on the respiratory control ratio (RCR) and the ADP/O ratio in the adult weevil *Sitophilus oryzae* (Coleoptera, Curculionidae). *Endocytobiosis & Cell. Res.*, 1991, Vol. 8, p. 61-73.

Heizen, R., Stiegler, G.L., Whiting, L.L., Schmitt, S.A., Mallavia, L.P. et Frazier, M.E. Use of pulsed field gel electrophoresis to differentiate *Coxiella burnetii* strains. *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, 1990, Vol. 590, p. 504-513.

Hemmingsen, S.M., Woolford, C., Van der Vies, S.M., Tilly, K., Dennis, D.T., Georgopoulos, C.P., Hendrix, R.W. et Ellis, R.J. Homologous plant and bacterial proteins chaperone oligomeric protein assembly. *Nature*, 1988, Vol. 333, p. 330-334.

Hendrick, J.P. et Hartl, F.U. Molecular chaperone functions of heat-shock proteins. *Annu. Rev. Biochem.*, 1993, Vol. 62, p. 349-384.

Hendrick, J.P. et Hartl, F.U. The role of molecular chaperones in protein folding. *FASEB J*., 1995, Vol. 9, N°15, p. 1559-1569.

Hendrix, R.W. Purification and properties of GroE, a host protein involved in bacteriophage assembly. *J. Mol. Biol*., 1979, Vol. 129, p. 375-392.

Henry, S.M. et Block, R.H. The sulphur metabolism of insects. VI- Metabolism of the sulphur amino acids and related compounds in the German cockroach, *Blattella germanica* (L.). *Contr. Boyce Thompson Inst. Pl. Res.*, 1961, Vol. 21, p. 129-144.

Herdman, M. The evolution of bacterial genomes. *The evolution of genome size*. Edited by Cavalier-Smith T., New York : John Willey & Sons, Inc., 1985, p. 37-68.

Ho, Y. et Zhang, Y.X. The sequence of the *groES* and *groEL* genes from the mouse pneumonitis agent of *Chlamydia trachomatis*. *Gene*, 1994, Vol. 141, N°1, p. 143-144.

Hoffman, P.S., Houston, L. et Butler, C.A. *Legionella pneumophila* htpAB heat shock operon: nucleotide sequence and expression of the 60-kilodalton antigen in *L. pneumophila*-infected Hela cells. *Infect. Immun.*, 1990, Vol. 58, p. 3380-3387.

Houk, E.J., Griffiths, G.W. et Beck, S.D. Lipid metabolism in the symbiotes of the pea aphid, *Acyrthosiphon pisum*. *Comp. Biochem. Physiol.*, 1976, Vol. 54, p. 427-431.

Hunt, J.F., Weaver, A.J., Landry, S.J., Gierasch, L. et Deisenhofer, J. The crystal structure of the GroES co-chaperonin at 2.8 A resolution. *Nature*, 1996, Vol. 379, p. 37-45.

Hurst, L.D. et McVean, G.T. Evolutionary genetics : ... and scandalous symbionts. *Nature*, 1996, Vol. 381, p. 650-651.

Ikemura, T. Codon usage and tRNA content in unicellular and multicellular organisms. *Mol. Biol. Evol.*, 1985, Vol. 2, p. 13-34.

Ishikawa, H. Host-symbiont interactions in the protein synthesis in the pea aphid, *Acyrthosiphon pisum. Insect Biochem.*, 1982a, Vol. 12, N°6, p. 613-622.

Ishikawa, H. DNA, RNA and protein synthesis in the isolated symbionts from the pea aphid, *Acyrthosiphon pisum. Insect Biochem.*, 1982b, Vol. 12, N°6, p. 605-612.

Ishikawa, H. Control of macromolecule synthesis in the aphid endosymbiont by the host insect. *Comp. Biochem. Physiol.*, 1984a, Vol. 78B, N°1, p. 51-57.

Ishikawa, H. Alteration with age of symbiosis of gene expression in aphid endosymbionts. *Biosystems*, 1984b, Vol. 17, p. 127-134.

Ishikawa, H. Symbionin, an aphid endosymbiont-specific protein. -II- Diminution of symbionin during post embryonic development of aposymbiotic insects. *Insect Biochem.*, 1985, Vol. 15, N°2, p. 165-174.

Ishikawa, H. Nucleotide composition and kinetic complexity of the intracellular symbiont of the pea aphid *Acyrthosiphon pisum*. *J. Mol. Evol.*, 1987, Vol. 24, P. 205-211.

Ishikawa, H. Biochemical and molecular aspects of the aphid endocytobiosis. *Insect Endocytobiosis : morphology, physiology, genetics, evolution.* Edited by W. Schwemmler and G. Gassner, Washington : CRC press., 1989a, p. 123-143.

Ishikawa, H. Biochemical and molecular aspects of endosymbiosis in insects. *Internat. Rev. Cyt.*, 1989b, p. 1-45.

Ishikawa, H. et Hashimoto, H. The molecular biology of symbiotic bacteria of Aphididae. *Microbiol. Sci.*, 1986, Vol. 3, N°4, p. 117-120.

Ishikawa, H., Hashimoto, H. et Yamaji, M. Symbionin, an aphid endosymbiont-specific protein. -III- Symbionin present in the male, ovipara and fundatrix. *Insect Biochem.*, 1986, Vol. 16, N°2, p. 299-306.

Ishikawa, H. et Yamaji, M. A species-specific protein of an aphid is produced by its endosymbiont. *Zool. sci.*, 1985a, Vol. 2, p. 285-287.

Jacquier-Sarlin, M.R. et Polla, B.S. Protéines de stress : soi, non soi et réponse immune. *Médecine/sciences*, 1994, Vol. 10, p. 31-41.

Jéon, K.W. Integration of bacterial endosymbionts in Amoebae. *International review of Cytology*, 1983, Vol. 14, p. 29-47.

Jéon, K.W. Bacterial endosymbiosis in Amoebae. *Tr. Cell. Biol.*, 1995, Vol. 5, N°3, p. 137-140.

Juchault, P., Rigaud, T. et Mocquard, J.P. Evolution of sex-determining mechanisms in a wild population of *Armadillidium vulgare* Latr. (Crustacea, Isopodae): competition between two feminizing parasitic sex factors. *Heredity*, 1992, Vol. 69, p. 382-390.

Kaufmann, S.H.E. The cellular immune response to heat shock proteins. *Experimenta*, 1992, Vol. 48, p. 640-643.

Kawata, Y., Nosaka, K., Hongo, K., Mizobata, T. et Nagai, J. Chaperonin GroE and ADP facilitate the folding of various proteins and protect against heat inactivation. *FEBS Lett.*, 1994, Vol. 345, N°2-3, p. 229-232.

Kimura, M. *The neutral theory of molecular evolution*. Cambridge : Cambridge Univ. Press, 1983, p. 25-34.

Koch, A. Insect and their endosymbionts, *Symbiosis.* New York : Academic Press, 1967, 106 p.

Kondrashov, A.S. Classification of hypothesis on the advantage of amphimixis. *J. Hered.*, 1993, Vol. 84, p. 372-387.

Krane, D.E., Hartl, D.L. et Ochman, H. Rapid determination of nucleotid content and its application to the study of genome structure. *Nucleic Acids Res.*, 1991, Vol. 19, N°19, p. 5181-5185.

Krawiec, S. et Riley, M. Organization of the bacterial chromosome. *Microbiological reviews*, 1990, Vol. 54, N°4, p. 502-539.

Krieg, N.R. et Holt, J.G. *Bergey's Manual of systematic bacteriology*. Baltimore: Williams &Wilkins, Vol. 1, 1984, p. 1-964, Vol. 2, 1986, p. 965-1599, Vol. 3, 1989, p.1600-2298, Vol. 4, 1989, p. 2299-2648.

Laemmli, U.K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, 1970, Vol. 227, N°5259, p. 680-685.

Lake, J.A. et Rivera, M.C. Was the nucleus the first endosymbiont? *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1994, Vol. 91, N°8, p. 2880-2881.

Landry, S.J. et Gierasch, L.M. Recognition of nascent polypeptides for targeting and folding. *Trends Biochem. Sci.*, 1991, Vol. 16, p. 159-163.

Landry, S.J., Zeilstraryalls, J., Fayet, O., Georgopoulos, C. et Gierasch, L.M. Characterization of a functionally important mobile domain of GroES. *Nature*, 1993, Vol. 364, N°6434, p. 255-258.

Langer, T. et Neupert, W. Heat shock proteins Hsp60 and Hsp70 : Their roles in folding, assembly and membrane translocation of proteins. *Current topics in microbiology and immunology. Heatshock proteins and immune response.* Berlin : Springer-Verlag, 1991, p. 3-30.

Laskey, R.A. Nucleosomes are assembled by an acidic protein which binds histones and transfers them to DNA. *Nature*, 1978, Vol. 275, p. 416-420.

Lathigra, R.B., Butcher, P.D., Garbe, T.R. et Young, D.B. Heat shock protein as virulence factors of pathogens. *Current topics in microbiology and immunology. Heatshock proteins and immune response.* Berlin : Springer-Verlag, 1991, p. 125-144.

Laviolette, P. et Nardon, P. Action des rayons gamma du Cobalt 60 sur la mortalité et la fertilité des adultes d'un charançon du riz. *Bull. Biol. Fr. Belg.*, 1963, Vol. 97, p. 305-33.

Li, M. et Wong, S.L. Cloning and characterization of the *groESL* operon from *Bacillus subtilis*. *J. Bacteriol.*, 1992, Vol. 174, p. 3981-3992.

Liadouze, I. *Etude du métabolisme azoté d'*Acyrthosiphon pisum *(Harris) (Homoptera : Aphididae), Intervention des bactéries symbiotiques.* Thèse : Sci. : Institut national des Sciences Appliquées de Lyon, 1995, 260p.

Liadouze, I., Febvay, G., Bonnot, G. Metabolic fate of energetic amino acids in the aposymbiotic pea aphid *Acyrthosiphon pisum* (Harris) (Homoptera: Aphididae). *Symbiosis*, 1996, Vol. 21, p. 115-127.

Lindler, L.E. et Hayes, J.M. Nucleotide sequence of the *Salmonella typhi groEL* heat shock gene. *Microb. Pathology*, 1994, Vol. 17, N°4, p. 271-275.

Lindquist, S. The heat shock response. *Ann. Rev. Biochem.*, 1986, Vol. 55, p. 1151-1191.

Liu, S.L., Hessel, A. et Sanderson, K.E. Genomic mapping with *I-Ceu I*, an intron-encoded endonuclease specific for genes of ribosomal RNA, in *Salmonella* spp., *Escherichia coli*, and other bacteria. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1993a, Vol. 90, p. 6874-6878.

Liu, S.L., Hessel, A. et Sanderson, K.E. The XbaI-BlnI-CeuI genomic cleavage map of *Salmonella enteritis* shows an inversion relative to *Salmonella typhimurium* LT2. *Mol. Microbiol.*, 1993b, Vol. 10, p. 655-664.

Loiseleur, J. *Techniques de Laboratoire*. Paris. : Masson & Cie, 1963, Tome 1., p. 722.

Louis C., Pintureau, B. et Chapelle, L. Recherches sur l'origine de l'unisexualité: la thermothérapie élimine à la fois rickettsies et parthénogénèse thélytoque chez un trichogramme (Hym., Trichogrammatidae). *C. R. Acad. Sci. Paris.*, 1993, Vol. 316, p.27-33.

Love, B.C., Hansen, L.M. et Hirsh, D.C. Cloning and sequence of the *groESL* heat-shock operon of *Pasteurella multocida*. *Gene*, 1995, Vol. 166, N°1, p. 179-180.

Lucier, T.S. et Brubaker, R.R. Determination of genome size, macrorestriction pattern polymorphism, and nonpigmentation-specific deletion in *Yersinia pestis* by pulsed field gel electrophoresis. *J. Bacteriol.*, 1992, Vol. 174, N°7, p. 2078-2086.

Lum, P.T.M. et Baker, J.E. Development of mycetomes in larvae of *Sitophilus granarius* and *Sitophilus oryzae* (Col.). *Ann. Entomol. Soc. Amer.*, 1973, Vol. 66, N°6, p. 1261-1263.

Maeda, H., Miyamoto, M., Hongyo, H., Nagai, A., Kurihara, H. et Murayama, Y. Heat shock protein 60 (GroEL) from *Porphyromonas gingivalis*: molecular cloning and sequence analysis of its gene and purification of the recombinant protein. *FEMS Microbiol. Lett.*, 1994, Vol. 119, N°1-2, p. 129-135.

Maidak B.L., Larson N., McCaughey M.J., Overbeek R., Olsen K., Fogel K., Blandy J., Woese C.R. The ribosomal data base project. *nucleic Acids Res.*, 1994, Vol. 22, p. 3485-3487.

Maniloff, J. The minimal cell genome : "On being the right size". *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1996, Vol. 93, p. 10004-10006.

Mansour, K. Preliminary studies on the bacterial cell mass (accessory cell mass) of *Calandra oryzae*: the rice wevil. *Q. J. Microsc. Sci.*, 1930, Vol. 73, p. 421-436.

Mansour, K. On the so-called symbiotic relationship between coleopterous insect and intracellular microorganisms. *Q. J. Microsc. Sci.*, 1934, Vol. 77, p. 255-272.

Mansour, K. On the microorganism free and the infected *Calandra granarius*. *Bull. Soc. Entomol. Egypt*., 1935, p. 290-306.

Margulis, L. *Symbiosis in cell evolution*. San Fransisco : Freeman W.H., 1993, 419p.

Marmur, J. et Doty, P. Determination of the base composition of deoxyribonucleic acid from its thermal denaturation temperature. *J. Mol. Biol.*, 1962, Vol. 5, p. 109-118.

Martinus, R.D., Ryan, M.T., Naylor, D.J., Herd, S.M., Hoogenraad, N.J. et Hoj, P.B. Role of chaperones in the biogenesis and maintenance of the mitochondrion. *FASEB J.*, 1995, Vol. 9, N°5, p. 371-378.

Masterson, R.V., Russell, P.R. et Atherly, A.G. Nitrogen fixation (nif) genes and large plasmids of *Rhizobium japonicum*. *Journal of Bacteriology*, 1982, Vol. 152, N°2, p. 928-931.

Maynard-Smith, J. *Evolutionary genetics*. Oxford : Oxford University Press, 1989a, p. 301-304.

Maynard-Smith, J. Generating novelty by symbiosis. *Nature*, 1989b, Vol. 341, p. 284-285.

Mccarty, J.S., Rudiger, S., Schonfeld, H.J., Schneidermergener, J., Nakahigashi, K., Yura, T. et Bukau, B. Regulatory region c of the *E. coli* heat shock transcription factor, sigma(32), constitutes a DnaK binding site and is conserved among Eubacteria. *J. Mol. Biol.*, 1996, Vol. 256, N°5, p. 829-837.

Megias, M., Folch, J.L. et Sousa, C. Control of the expression of bacterial genes involved in symbiotic nitrogen fixation. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 1993, Vol. 9, p. 444-454.

Mehra, V., Sweetser, D. et Yong, R.A. Efficient mapping of protein antigenic determinants. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1986, Vol. 83, p. 7013-7017.

Mereschkowski, C. La plante considérée comme un complexe symbiotique. *Bulletin de la Société des Sciences Naturelles Ouest de la France*, 1920, Vol. 6, p. 17-21.

Mittler, T.E. Dietary amino acid requirements of the aphid *Myzus persicae* affected by antibiotic uptake. *J. Nutr.*, 1971, Vol. 101, p. 1023-1028.

Mizobata, T. et Kawata, Y. Functional mechanism of the molecular chaperone GroE. *Nippon Nogeikagaku Kaishi*, 1996, Vol. 70, N°5, p. 576-579.

Mollenhauer, J. et Schulmeister, A. The humoral immune response to heat shock proteins. *Experimenta*, 1992, Vol. 48, p. 644-649.

Moran, N. Accelerated evolution and Muller's rachet in endosymbiotic bacteria, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1996, Vol. 93, pp. 2873-2878.

Moran, N. et Bauman, P. Phylogenetics of cytoplasmically inherited microorganisms of arthropods. *Trends in Ecology and Evolution*, 1994, Vol. 9, N°1, p. 15-20.

Moran, N.A., Dohlen, C.D. et Baumann, P. Faster evolutionary rates in endosymbiotic bacteria than in cospeciating insect hosts. *J. Mol. Evol.*, 1995, Vol. 41, p. 727-731.

Morange, M. Les molécules chaperons. *La Recherche*, 1993, Vol. 24, p. 1238-1244.

Morange, M. et Bensaude, O. Les chaperons moléculaires. *Regard Biochim.*, 1990, Vol. 1, p. 13-16.

Morioka, M., Hiromichi M. et Ishikawa H. Chaperonine produced by an intracellular symbiont is an energy-coupling protein with phosphotransferase activity. *J. Biochem.*, 1993a, Vol. 114, p. 246-250.

Morioka, M., Ishikawa, H. Mutualism based on stress : selective synthesis and phosphorylation of a stress protein by an intracellular symbiont. *J. Biochem.*, 1992, Vol. 111, p.431-435.

Morioka, M. et Ishikawa H. Self-assembly of symbionin, a chaperonin of intracellular symbiont. *J. Biochem.*, 1993b, Vol. 114, p. 468-472.

Mou, J., Sheng, S.J., Ho, R. et Shao, Z. Chaperonins GroEL and GroES : views from atomic force microscopy. *Bioph. J.*, 1996, Vol. 71, p. 2213-2221.

Munson, M.A., Baumann, P. et Moran, N.A. *Buchnera* gen. nov. and *Buchnera aphidicola* sp. nov., a taxon consisting of the mycetocyte-associated, primary endosymbionts of aphids. *Int. J. Syst. Bacteriol.*, 1991, Vol. 41, p. 566-568.

Murray, F.V. et Tiegs, O.W. The metamorphosis of *Calandra oryzae*. *Q. J. Microsc. Sci.*, 1935, Vol. 77, p;404-495.

Musgrave, A.J. Insect mycetomes. *Can. Entomol.*, 1964, Vol. 96, p. 377-389.

Musgrave, A.J. Grinyer, I. et Homan, R. Some aspects of the fine structure of the mycetomes and mycetomal microorganisms of *Sitophilus* weevils. *Can. J. Microbiol.*, 196, Vol. 8, p. 747-751.

Musgrave, A.J. et McDermott, L.A. Some media used in an attempt to isolate and culture the mycetomal microorganisms of *Sitophilus* weevils. *Can. J. Microbiol.*, 1961, Vol. 7, p. 842-843.

Musgrave, A.J. et Miller, J.J. Some microorganisms associated with the weevils, *Sitophilus granarius* and *Sitophilus oryzae*. I - Distribution and description of the organisms. *Can. Ent.*, 1953, Vol. 85, p. 387-390.

Muto, A. et Osawa, S. The guanine and cytosine content of genomic DNA and bacterial evolution. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1987, Vol. 84, p. 166-169.

Narberhaus, F. et Bahl, H. Cloning, sequencing, and molecular analysis of the *groESL* operon of *Clostridium acetobutylicum*. *J. Bacteriol.*, 1992, Vol. 174, p. 3282-3289.

Nardon, P. Les possibilités d'emploi des radiations dans la lutte contre les insectes. *Phytoma*, 1963, Vol. 144, p. 7-12.

Nardon, P. Contribution a l'étude des symbiotes ovariens de *Sitophilus sasakii* : localisation, histochimie et ultrastructure chez la femelle adulte. *C. R. Acad. Sci. Paris*, 1971, Vol. 272D, p. 2975-2978.

Nardon, P. Obtention d'une souche asymbiotique chez le charançon *Sitophilus sasakii* Tak : différentes méthodes d'obtention et comparaison avec la souche symbiotique d'origine.*C. R. Acad. Sci. Paris*, 1973, Vol. 277D, p. 981-984.

Nardon, P. *Etude des interactions physiologiques et génétiques entre l'hôte et les symbiotes chez le coléoptère Curculionidae* Sitophilus sasakii *(=* S. oryzae*).* Thèse : Sci. : Institut National des Sciences Appliquées et Université Lyon1, 1978, 285p.

Nardon, P. Cell to cell interactions in insect endocytobiosis. *Cell to cell signals in plant, animal and microbial symbiosis.* Edited by Scannerini S., Berlin : Springer-verlag, 1988, p. 85-100.

Nardon, P. Rôle de la symbiose dans l'adaptation et la spéciation. *Bull. Soc. Zool. Fr*., 1995, Vol. 120, p. 397-406.

Nardon, P. et Grenier, A.M. Genetical and biochemical interactions between the host and its endosymbiotes in the weevil *Sitophilus* (Coleoptera, Curculionidae) and other related species.*Cell to cell signals in plant, animal and microbial symbiosis.* Edited by Scannerini S., Berlin : Springer-verlag, 1988, p. 255-270.

Nardon, P. et Grenier, A.M. Symbiose et évolution. *Ann. Soc. Entomol. Fr. (N.S.)*, 1993, Vol. 29, N°2, p. 113-140.

Nardon, P., Louis, C., Nicolas, G. et Kermarrec, A. Mise en évidence et étude des bactéries symbiotiques chez deux charançons parasites du bananier : *Cosmopolites sordidus* (GERMAR) et *Metamasius hemipterus* (L.) (Col. Curculionidae). *Annls Soc. Ent. Fr. (N. S.)*, 1985, Vol. 21, N°3, p. 245-258.

Nardon, P. et Wicker, C. La symbiose chez le genre *Sitophilus* (Coléoptère, Curculionidae). Principaux aspects morphologiques, physiologiques et génétiques. *Ann. Biol.*, 1981, Vol. 4, p. 329-373.

Neidhardt, F.C. et VanBogelen, R.A. *Heat shock response. In "*Escherichia coli *and* Salmonella typhimurium*": Cellular and Molecular Biology*. Edited by Neidhardt F.C., Ingraham J.L., Low K.B., Magasanik B., Schaechter M., Umbarger H.E. Washington DC. : American Society for Microbiology, 1987, p. 1334-1345.

Nogge, G. Sterility in tsetse flies (*Glossina morsitans* Westwood) caused by loss of symbionts. *Experientia*, 1976, Vol. 32, p. 995-1002.

Noland, J.L., Lilly, J.H. et Baumann, C.A. Vitamin requirements of the cockroach *Blattella germanica* L. *Ann. Entomol. Soc. Am.*, 1949, Vol. 42, p. 154-164.

Normore, W.M. et Brown, J.R. G+C composition in bacteria. *Handbook of biochemistry: selected data for molecular biology.* Cleveland : CRC press, Inc, 1970, p. 24-74.

O'Neill, S.L. et Karr, T.L. Bidirectional incompatiblity between conspecific population of *Drosophila simulans*. *Nature*, 1990, Vol. 348, p. 178-180.

Ohtaka, C. et Ishikawa, H. Accumulation of adenine and thymine in a *groE*-homologous operon of an intracellular symbiont. *J. mol. Evol.*, 1993, Vol. 36, N°2, p. 121-126.

Ohtaka, C., Nakamura, H. et Ishikawa, H. Structures of chaperonins from an intracellular symbiont and their functional expression in *Escherichia coli* GroE mutants. *J. Bacteriol.*, 1992, Vol. 174, N°6, p. 1869-1874.

Oliver, J.L. et Marin, A. A Relationship between GC content and coding sequence length. *J. Mol. Evol.*, 1996, Vol. 43, p. 216-223.

Osawa, S., Ohama, T., Yamao, F., Muto, A., Jukes, T.H., Ozeki, H. et Umesono, K. Directional mutation pressure and transfer RNA in choice of the third nucleotide of synonymous two-codon sets. *Prod. Natl. Acad. Sci. USA*, 1988, Vol. 85, p. 1124-1128.

Paillot, A. *L'infection chez les insectes*. Trévoux : G. Patissier, 1933.

Pannekoek, Y., Dankert, J. et Vanputten, J.P.M. Construction of recombinant neisserial Hsp60 proteins and mapping of antigenic domains. *Mol. Microbiol*., 1995, Vol. 15, N°2, p. 277-285.

Pant, N.C. et Dang, K. Physiology and elimination of intracellular symbiotes in some stored product beetles. *Insect and Mite Nutrition. Significance and implications in ecology and pest management.* Amsterdam : North-holland publishing company, 1972, p. 311-322.

Perrin, H. *Bioysystématique et écologie évolutive des* Curculio *(Coleoptera : Curculionidae) double radiation sur* Ficus *(Moraceae) et sur fagales.* Thèse : Sci. : Université Paris VI, 1991, 265 p.

Pierantoni, U. L'organo simbiotico nello sviluppo di *Calandra oryzae*. *Rend. Reale Acad. Sci. Fis. mat. Napoli*., 1927, Vol. 35, N°3a, p. 244-250.

Pintureau, B., Louis, C., Chapelle, L. Symbiose entre microorganismes et trichogrammes (Hym. : Trichogrammatidae) : intérêt pour la lutte biologique. *Bull. Soc. Zool. Fr*., 1993, Vol. 118, p.159-167.

Portier, P. *Les symbiotes*. Paris : Masson, 1918.

Polissi, A., Goffin, L. et Georgopoulos, C. The *Escherichia coli* heat shock response and bacteriophage lambda development. *FEMS Microbiol. Rev*., 1995, Vol. 17, N°1-2, p. 159-169.

Pose, P.S. Molecular characterization of two nuclear genes encoding *Zea mays* mitochondrial chaperonin 60. GenBank data base release 82.0 April 1994, locus: MZECPN60A, 1993.

Priest, F. et Austin, B. *Modern bacterial taxonomy*. London : Chapman & Hall, 1993, 228p.

Riba, G. Etude ultrastructurale de la multiplication et de la dégénérescence des symbiontes des larves de *Criocephalus rusticus* (Coleoptera, Cerambycidae) : influence du jeûne. Ann. *Soc. Ent. Fr. (N.S.)*, 1977, Vol. 13, N°1, p. 153-157.

Rospert, S., Looser, R., Dubaquie, Y., Matouschek, A., Glick, B.S. et Schatz, G. Hsp60-independent protein folding in the matrix of yeast mitochondria. *EMBO J.*, 1996, Vol. 15, N°4, p. 764-774.

Rousset, F., Bouchon, D., Pintureau, B., Juchault, P. et Solignac, M. *Wolbachia* endosymbionts responsible for various alterations of sexuality in arthropods. *Proc. R. Soc. Lond. Biol.*, 1992a, Vol. 250, p. 91-98.

Rousset, F., Vautrin, D. et Solignac, M. Molecular identification of *Wolbachia*, the agent of cytoplasmic incompatibility in *Drosophila simulans*, and variability in relation with host mitochondrial types. *Proc. R. Soc. Lond. Biol.*, 1992b, Vol. 247, p. 163-168.

Roux, V., Drancourt, M. et Raoult, D. Determination of genome size of *Rickettsia spp*. within the spotted fever group, using pulsed-field gel electrophoresis. *J. Bacteriol.*, 1992, Vol. 174, p. 7455-7457.

Saitou, N. et Nei, M. The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Mol. Biol. Evol.*, 1987, Vol. 4, p. 406-425.

Sali, A., Shakhnovich, E. et Karplus, M. How does a protein fold? *Nature*, 1994, Vol. 369, p. 248-251.

Sanger, F., Nicklen, S. et Coulson, A.R. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc Natl. Acad. Sci. USA*, 1977, Vol. 74, p. 5463-5467.

Sapp, J. Living together : symbiosis and cytoplasmic inheritance. *Symbiosis as a source of evolutionary innovation speciation and morphogenesis.* Edited by Margulis L. and Fester R., Cambridge : MIT press, 1991, p. 15-25.

Scheinert, W. Symbiose und embryonalentwicklung bei russel Käfern. *Z. Morphol. Oekol. Tiere*., 1933, Vol. 27, p.76-198.

Schildkraut, C.L., Marmur, J. et Doty, P. Determination of the base composition of deoxyribonucleic acid from its buoyant density in CsCl. *J. Mol. Biol.*, 1962, Vol. 4, p. 430-433.

Schumann, W. Regulation of the heat shock response in *Escherichia coli* and *Bacillus subtilis*. *J. Biosciences*, 1996, Vol. 21, N°2, p. 133-148.

Schwemmler, W. et Gassner, G. *Insect endocytobiosis: morphology, physiology, genetics, evolution*. Boca Raton : CRC Press, 1989.

Segal, G. et Ron, E.Z. The *groESL* operon of *Agrobacterium tumefaciens*: evidence for heat shock-dependent mRNA cleavage. *J. Bact.*, 1995, Vol. 177, N°3, p. 750-757.

Sharp, P.M. et Li, W.H. An evolutionary perspective on synonymous codon usage in unicellular organisms. 1986, *J. Mol. Evol.*, Vol. 24, p. 28-38.

Sherman, M.Y. et Goldberg, A.L. Heat shock in *Escherichia coli* alters the protein-binding properties of the chaperonin GroEL by inducing its phosphorylation. *Nature*, 1992, Vol. 357, p. 167-169.

Shultz, A., Tzschaschel, B. et Schumann, W. Isolation and analysis of mutants of the DnaK operon of *Bacillus subtilis*. *Mol. Microbiol.*, 1995, Vol. 15, p. 421-429.

Singh, B., Patel, H.V., Ridley, R.G., Freeman, K.B. et Gupta, R.S. Mitochondrial import of the human chaperonin (Hsp60) protein. *Biochem. biophys. Res. Comm.*, 1990, Vol. 169, N°2, p. 391-396.

Smith, C.L. et Condemine, G. New approaches for physical mapping of small genomes. *J. Bact.*, 1990, Vol. 172, N°3, p. 1167-1172.

Smith, C.L., Klco, S.R. et Cantor, C.R. Pulsed-field gel electrophoresis and the technology of large DNA molecules. *Genome analysis a practical approach.* Edited by Davis K.E. Oxford : IRL press, 1988, p. 41-61.

Smith, D.C. et Douglas, A.E. *The biology of symbiosis*. London : Edward Arnold, 1987, 302p.

Soldevila, A.I. et Jones, D. Characterization of a novel protein associated with the parasitization of lepidopteran hosts by an endoparasitic wasp. *Insect. Biochem. Mol. Biol.*, 1994, Vol. 24, N°1, p. 29-38.

Soldo, A.T., Brickson, S.A. et Larin, F. The size and structure of the genome of symbiote xenosome particule in the *Parauronema acutum*. *J. Gen. Microbiol.*, 1983, Vol. 129, N°5, p. 1317-1325.

Soldo, A.T., Godoy, G.A. et Brickson, S.A. Growth requirements of symbiont-free and symbiont *Lambda*-bearing *Paramecium octaurelia* 299 for folic acid and biopterin. *J. Protozool.*, 1982, Vol. 29, N°4, p. 612-615.

Solignac, M., Vautrin, D. et Rousset, F. Widespread occurrence of the proteobacteria *Wolbachia* and partial cytoplasmic incompatibility in *Drosophila melanogaster. C. R. Acad. Sci. Paris*, 1994, Vol. 317, p. 461-470.

Stanier, R.Y., Adelberg, E.A. et Ingraham, J. *The microbiological world*. Cambridge : University Press., 1976, 871 p.

Stouthamer, R., Luck, R.F. et Hamilton, W.D. Antibiotics cause parthenogenetic *Trichogramma* (*Hymenoptera*/*Trichogrammatidae*) to revert to sex. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1990, Vol. 87, p. 2424-2427.

Sueoka, N. On the genetic basis of variation and heterogeneity of DNA base composition. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1962, Vol. 48, p. 582-292.

Sueoka, N. Directional mutation pressure and neutral molecular evolution. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1988, Vol. 85, p. 2653-2657.

Sueoka, N. Directional mutation pressure, selective constraints and genetic equilibria. *J. Mol. Evol.*, 1992, Vol. 34, p. 95-114.

Sueoka, N. Intrastrand parity rules of DNA base composition and usage biases of synonymous codons. *J. Mol. Evol.*, 1995, Vol. 40, p. 318-325.

Thomas-Orillard, M. Paradoxical influence of an RNA virus on *Drosophila* host. *Endocytobiology and Cell Research*, 1990, Vol. 7, p. 97-103.

Tiivel, T. The endocytobiotic condition in insect cells. *Endocytobiology V.* Edited by Sato S., Ishida M., Ishikawa H., Tübingen : Tübingen university press, 1993, p. 87-93.

Tilly, K. et Georgopoulos, C. Evidence that the two *Escherichia coli groE* morphogenetic gene products interact *in vivo*. *J. Bacteriol.*, 1982, Vol. 149, p. 1082-1088.

Tilly, K., Spence, J. et Georgopoulos, C. Modulation of the stability of *Escherichia coli* heat shock regulatory factor 32. *J. Bacteriol*, 1989, Vol. 171, p. 1585-1589.

Tissière, A., Mitchell, H.K. et Tracy, U.M. Protein synthesis in salivary glands of *Drosophila melanogaster*: relation to chromosome puffs. *J. Mol. Biol.*, 1974, Vol. 85, p. 389-398.

Todd, M.J., Viitanen, P.V. et Lorimer, G.H. Dynamics of the chaperonin ATPase cycle: implications for facilitated protein folding. *Science*, 1994, Vol. 265, N°5172, p. 659-666.

Trent, J.D. A review of acquired thermotolerance, heat-shock proteins, and molecular chaperones in Archaea. *FEMS Microbiol Rev*, 1996, Vol. 18, N°2-3, p. 249-258.

Trent, J.D., Nimmesgern, E., Wall, J.S., Hartl, F.U. et Horwitch, A.L. A molecular chaperone from a thermophilic Archaebacterium is related to the eucaryotic protein t-complex polypeptide-1. *Nature*, 1991, Vol. 354, p. 490-493.

Valovage, W.D. et Brooks, M.A. Uric acid quantities in the fat body of normal and aposymbiotic german cockroaches, *Blattella germanica*. *Ann. Entomol. Soc. America*, 1979, p. 687-689.

Van den Heuvel, J.M., Verbeek, M. et Van der Wilk, F. Endosymbiotic bacteria associated with circulative transmission of potato leafroll virus by *Myzus persicae*. *J. Gen. Vir.*, 1994, Vol. 75, p. 2559-2565.

Van de Peer, Y., Van den Broeck, I., De Rijk, P. et De Wachter, R. Database on the structure of small ribosomal subunit RNA. *Nucleic Acids Res.*, 1994, Vol. 22, p. 3488-3494.

Van der Vies, S. et Georgopoulos, C. Regulation of chaperonin gene expression. *The chaperonin*, New York : Academic Press, 1996, p. 137-165.

Vahrson, U. et Wittig, U. *Analysis and Interpretation of DNA and protein sequence using MacMollyTetra*. Berlin : Karoi-Verlag, 1994.

Viale, A.M. et Arakaki, A.K. The chaperone connection to the origins of the eukaryotic organelles. *FEBS Lett*, 1994, Vol. 341, N°2-3, p. 146-151.

Vinogradov, A.E. Measurement by flow cytometry of genomic AT/GC ratio and genome size. *Cytometry*, 1994, Vol. 16, p. 34-40.

Wallin, D.E. *Symbionticism and the origin of species*. Baltimore : Williams and Wilkins, 1927.

Weissman, J.S., Kashi, Y., Fenton, W.A. et Horwich, A.L. GroEL-mediated protein folding proceeds by multiple rounds of binding and release of nonnative forms. *Cell*, 1994, Vol. 78, N°4, p. 693-702.

Welch, W. Les cellules et le stress. *Pour la science*, 1993, Vol. 189, p. 70-77.

Wicker, C. Differential vitamin and choline requirements of symbiotic and aposymbiotic *S. oryzae* (Coleoptera, Curculionidae). *Comp. Biochem. physiol.*, 1983, Vol. 76A, p. 177-182.

Wicker, C. *Etude d'interactions nutritionnelles et enzymatiques entre* Sitophilus oryzae *(Coléoptère, Curculionidae) et ses bactéries symbiotiques intracellulaires.* Thèse : Sci. : Institut National des Sciences Appliquées de Lyon, 1984, 196p.

Wicker, C. et Nardon, P. Development responses of symbiotic and aposymbiotic weevil *Sitophilus oryzae* L. (Coleoptera, Curculionide) to a diet supplemented with aromatic amino acids. *J. Insect Physiol.*, 1982, Vol. 28, N°12, p. 1021-1024.

Woese, C.R. et Fox, G.E. Phylogenetic structure of the prokaryotic domain: the primary kingdoms. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1977, Vol. 74, p. 5088-5090.

Wood, T.G. et Thomas, R.J. The mutualistic association between Macrotermitinae and *Termitomyces*. *Insect-fungus interactions.* Wilding, N., Collins, N.M., Hammond, P.M. et Webber, J.F., New York : Academic press, p. 69-92.

Yadava, R.P.S., Rattray, J.B.M. et Musgrave, A.J. Fatty acid profiles of two microbiologically different strains of granary weevil : *Sitophilus granarius* L. (Coleoptera). *Comp. Biochem. Physiol.*, 1972, Vol. 43, p. 383-391.

Yamaguchi, H., Miura, H., Ohsumi, K., Ishimi, N., Taguchi, H., Ishiyama, N., Shiraishi, Y., Yamamoto, T. et Ogata, S. Detection and characterization of antibodies to bacterial heat-shock protein 60 in sera of patients with primary biliary cirrhosis. *Microbiol. Immunol*., 1994, Vol. 38, N°6, p. 483-487.

Yura, T., Nogai, H. et Mori, H. Regulation of the heat-shock response in bacteria. *Ann. Rev. Microbiol.*, 1993, Vol. 47, p. 321-350.

Zeilstra-Ryalls, J., Fayet, O. et Georgopoulos, C. The universally conserved GroE (Hsp60) chaperonins. *Ann. Rev. Microbiol.*, 1991, Vol. 45, p. 301-325.

LISTE DES TRAVAUX ET COMMUNICATIONS DE L'AUTEUR

Publications

Charles, H., Ishikawa, H. et Nardon, P. Presence of a protein specific of endocytobiosis (symbionin) in the weevil *Sitophilus*. *C.R. Acad. Sci. Paris.*, 1995, Vol. 318, pp. 35-41.

Charles, H., Heddi, A. et Nardon, P. chaperonin-like in the endocytobiosis of the weevil *Sitophilus*. In : *Endocytobiology VI* , 1997, (sous presse).

Charles, H., Condemine, G., Nardon, C. et Nardon, P. Genome size characterization of the principale endocellular symbiotic bacteria of the weevil *sitophilus oryzae*, using pulse field gel electrophoresis. *Insect Biochem. Molec. Biol*., 1997, Vol. 27, pp. 345-350.

Charles, H., Heddi, A., Guillot, J., Nardon, C. and Nardon, P. Protein analysis in the endosymbiosis of the weevil *Sitophilus oryzae* (Coleoptera, Curculionidae): over-expression of a chaperonin, (soumis).

Charles, H. et Nardon, P. La protéine Hsp60 : chaperon moléculaire de la symbiose intracellulaire, (soumis).

Heddi, A., Charles, H., Khatchadourian, C., Bonnot, G. et Nardon, P. Molecular characterization of the principal symbiotic bacteria of the weevil *Sitophilus oryzae*: phylogenetic position and DNA composition, (soumis).

Nardon P., Charles H. (1996) Un modèle de symbiose : le charançon *Sitophilus oryzae*; Implications évolutives. Colloque sur l'Evolution. Lyon (Université Catholique). 12-13/01/96. (sous presse).

Participation à des congrès

Charles H. et Nardon P. (1995) A chaperonin in the endocytobiosis of the weevil *Sitophilus oryzae*. *7th European Congress on Biotechnology*. Nice19-23/02/1995. (Poster).

Charles H, Nardon P. (1995) Interactive proteins in the weevil *Sitophilus* endocytobiosis. *The sixth International Colloquium on Endocytobiology and Symbiosis.* Tübingen 6-10/09/95. (Communication Orale)

Charles H., Jian-Qun Chen (1996) Les insectes à l'INSA : Interaction plante/insecte : le modèle puceron ; Interaction insecte/bactérie : le modèle charançon. *2ième Colloque des doctorants de l'INSA de Lyon* (04/04/1995). (Poster).

Charles H., Nardon P. (1996) Analysis of specific proteins of symbiosis in the weevil *Sitophilus*. *XXth International Congress of Entomology*. Florence. 25-31/08/96. (Communication orale)

FOLIO ADMINISTRATIF

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

NOM : CHARLES

Avec précision du nom de jeune fille, le cas échéant)

Prénom : Hubert

DATE de SOUTENANCE

24 juin 97

TITRE : Aspects moléculaires de la bactérie symbiotique principale du charançon des céréales Sitophilus oryzae (Coléoptère, Curculionidae) et étude de ses interactions avec l'hôte

NATURE : Doctorat

Numéro d'ordre : 97ISAL0041

Formation doctorale : Analyse et modélisation des systèmes biologiques

Cote B.I.U. – Lyon : T 50/210/19 / et bis

CLASSE :

RESUME :

Le charançon des céréales Sitophilus orizae (Coléoptère, Curculionidae) héberge des bactéries symbiotiques (endocytobiotes) dans les cellules spécialisées appelées bactériocytes. Ces bactéries sont très intégrées dans le métabolisme de leur hôte et sont transmises d'une génération à l'autre par hérédité cytoplasmique. Dans une 1ère partie, l'analyse des séquences des gènes hsp10, hsp60 et rss des endocytobiotes de S. oryzae nous a permis de montrer que ces bactéries symbiotiques appartiennent à la famille de Enterobacteriaceas et sont très proche d'Erwinia herbicola. La taille de leur génome a été estimée à 3.0 Mb par électrophorèse en champs pulsés, ce qui représente environ 60% de la taille des génomes de la plupert des Enterobacteriaceae. Enfin, le taux de C+G de l'ADN des endocytobiotes a été estimé à 54+/- 2% par chromatographie. Dans une 2ème partie, nous nous sommes attachés à la caractérisation d'éventuelles protèines d'interactions entre l'hôte et ses endocytobiotes. La comparaison des profils d'électrophorèse bidimensionnelle des couches symbiotiques et aposymbiotique de S. oryzae a permis de révéler l'existence d'une protéine en quantité très importante par les endocytobiotes. En effet, l'expression de cette protèine para^t sélectivement induite lorsque les endocytobiotes sont dans les bactériocytes. La partie codante de l'opéron grosE des endocytobiotes (codant les protèines Hsp10 et Hsp60) a finalmement été séquencée et des expériences préliminaires sur la régulation de cet opéron en cas de stress thermique ont été réalisées. Cette étude moléculaire sur les relations hôte/endocytobiotes chez le charançon des céréales Sitophilus oryzae s'inscrit dans le cadre plus général de la théorie d'évolution par endosymbioses en série. Elle apporte quelques argument supplémentaires montrant l'importance du rôle de la symbiose dans l'évolution des organismes.

MOTS-CLES : Evolution biologique, symbiose intracellulaire, insecta, coleoptera, sitphilus oryzae, protèine de choc thermique, composition chimique, DNA

Laboratoire(s) de recherche : Laboratoire de Biologie Appliquée de l'INSA de Lyon

Directeur de thèse : NARDON, Paul

Président du jury :

Mr O. Fayet, Mr C. Gautier, Mr P. Lejeune, Mr P. Nardon, Mr G. Riba, Mr T. Rigaud