N°d'ordre NNT : 2025ISAL0089

THESE de DOCTORAT DE L'INSA LYON,
membre de l'Université de Lyon

Ecole Doctorale N° 341
(Evolution, Ecosystèmes, Microbiologie, Modélisation)

Spécialité/ discipline de doctorat :
Micro-organismes, interactions, infections

Soutenue publiquement le 27/10/2025, par :
Hugo Terrasson

Rôle des peptides « Bacteriocyte-specific Cysteine-Rich » dans le contrôle de la symbiose chez *Acyrthosiphon pisum*

Devant le jury composé de :

Duperron, Sébastien	Professeur des Universités, MNHN, Paris	Président/Rapporteur
Mergaert, Peter	Directeur de Recherche CNRS, Gif-sur-Yvette	Rapporteur
Duron, Olivier	Directeur de Recherche CNRS, Montpellier	Examinateur
Ribeiro Lopes, Mélanie	Maître de Conférences INSA, Lyon	Examinatrice
Da Silva, Pedro	Professeur des Université INSA, Lyon	Co-directeur de thèse
Calevro, Federica	Directrice de Recherche INRAE, Lyon	Co-directrice de thèse

Thèse accessible à l'adresse : https://theses.insa-lyon.fr/publication/2025ISAL0089/these.pdf © [H. Terrasson], [2025], INSA Lyon, tous droits réservés

Thèse accessible à l'adresse : https://theses.insa-lyon.fr/publication/2025ISAL0089/these.pdf © [H. Terrasson], [2025], INSA Lyon, tous droits réservés

Département FEDORA – INSA Lyon - Ecoles Doctorales

SIGLE	ECOLE DOCTORALE	NOM ET COORDONNEES DU RESPONSABLE
ED 206 CHIMIE	**CHIMIE DE LYON** https://www.edchimie-lyon.fr Sec. : Renée EL MELHEM Bâtiment Blaise PASCAL 7, Avenue Jean Capelle, 69621 Villeurbanne CEDEX secretariat@edchimie-lyon.fr	**M. Stéphane DANIELE** C2P2-CPE LYON-UMR 5265 Bâtiment F308, BP 2077 43 Boulevard du 11 novembre 1918, 69616 Villeurbanne CEDEX directeur@edchimie-lyon.fr
ED 341 E2M2	**ÉVOLUTION, ÉCOSYSTÈME, MICROBIOLOGIE, MODÉLISATION** http://e2m2.universite-lyon.fr Sec. : Bénédicte LANZA Bâtiment Atrium, 43, Boulevard du 11 Novembre 1918, 69622 Villeurbanne CEDEX Tél : 04.72.44.83.62 secretariat.e2m2@univ-lyon1.fr	**Mme Sandrine CHARLES** Université Claude Bernard Lyon 1 UFR Biosciences, Bâtiment Mendel 43, Boulevard Du 11 Novembre 1918, 69622 Villeurbanne CEDEX e2m2.codir@listes.univ-lyon1
ED 205 EDISS	**INTERDISCIPLINAIRE SCIENCES-SANTÉ** http://ediss.universite-lyon.fr Sec. : Bénédicte LANZA Bâtiment Atrium, Université Claude Bernard Lyon 1 43, Boulevard du 11 Novembre 1918, 69622 Villeurbanne CEDEX Tél : 04.72.44.83.62 secretariat.ediss@univ-lyon1.fr	**M. Jérôme LAMARTINE** Université Claude Bernard Lyon 1 Equipe Intégrité Fonctionnelle du Tissu Cutané LBTI - UMR5305 CNRS IBCP - 7 passage du Vercors, 69367 Lyon CEDEX 07 Tel : 04.72.72.26.66 jerome.lamartine@univ-lyon1.fr
ED 34 EDML	**MATÉRIAUX DE LYON** http://ed34.universite-lyon.fr Sec. : Yann DE ORDENANA Tél : 04.72.18.62.51 yann.de-ordenana@ec-lyon.fr	**M. Stéphane BENAYOUN** Ecole Centrale de Lyon Laboratoire LTDS 36 Avenue Guy de Collongue, 69134 Ecully CEDEX Tél : 04.72.18.64.37 stephane.benayoun@ec-lyon.fr
ED 160 EEA	**ÉLECTRONIQUE, ÉLECTROTECHNIQUE, AUTOMATIQUE** https://edeea.universite-lyon.fr Sec. : Philomène TRECOURT Bâtiment Charlotte PERRIAND, 69621 Villeurbanne CEDEX Tél : 04.72.43.71.70 secretariat.edeea@insa-lyon.fr	**M. Philippe DELACHARTRE** INSA LYON Laboratoire CREATIS, Bâtiment Blaise Pascal, 7 Avenue Jean Capelle, 69621 Villeurbanne CEDEX Tél : 04.72.43.88.63 philippe.delachartre@insa-lyon.fr
ED 512 INFOMATHS	**INFORMATIQUE ET MATHÉMATIQUES** http://edinfomaths.universite-lyon.fr Sec. : Renée EL MELHEM Bâtiment Blaise PASCAL 7, Avenue Jean CAPELLE, 69621 Villeurbanne CEDEX Tél : 04.72.43.80.46 infomaths@univ-lyon1.fr	**M. Dragos IFTIMIE** Université Claude Bernard Lyon 1 Bâtiment Braconnier 21 Avenue Claude BERNARD, 69 622 Villeurbanne CEDEX Tél : 04.72.44.79.58 direction.infomaths@listes.univ-lyon1.fr
ED 162 MEGA	**MÉCANIQUE, ÉNERGÉTIQUE, GÉNIE CIVIL, ACOUSTIQUE** http://edmega.universite-lyon.fr Sec. : Philomène TRECOURT Tél : 04.72.43.71.70 Bâtiment Charlotte PERRIAND, 69621 Villeurbanne CEDEX mega@insa-lyon.fr	**M. Etienne PARIZET** INSA Lyon Laboratoire LVA Bâtiment St. Exupéry 25 bis Avenue Jean CAPELLE, 69621 Villeurbanne CEDEX etienne.parizet@insa-lyon.fr
ED 483 ScSo	**ScSo**[1] https://edsciencessociales.universite-lyon.fr Sec. : Mélina FAVETON Tél : 04.78.69.72.76 Université Lyon 2 Campus Berges du Rhône, Bureau BEL 309 18, Quai Claude BERNARD, 69365 LYON CEDEX 07 melina.faveton@univ-lyon2.fr	**M. Bruno MILLY** Université Lyon 2 Campus Berges du Rhône Bureau BEL 204 18, Quai Claude BERNARD 69365 LYON CEDEX 07 bruno.milly@univ-lyon2.fr

[1] ScSo : Histoire, Géographie, Aménagement, Urbanisme, Archéologie, Science politique, Sociologie, Anthropologie

Thèse accessible à l'adresse : https://theses.insa-lyon.fr/publication/2025ISAL0089/these.pdf © [H. Terrasson], [2025], INSA Lyon, tous droits réservés

Thèse accessible à l'adresse : https://theses.insa-lyon.fr/publication/2025ISAL0089/these.pdf © [H. Terrasson], [2025], INSA Lyon, tous droits réservés

REMERCIEMENTS

Et voilà, c'est la fin d'une aventure ! La fin d'une expérience composée elle-même de nombreuses autres. Puis la fin d'une écriture. Une fin qui signe le début de nouvelles histoires pour moi. C'est avec émotion et fierté que j'écris ces lignes qui me permettent de rendre à « César ce qui appartient à César ». Car oui, c'est peut-être bateau de dire ça, mais c'est tellement vrai : une thèse n'est possible que grâce à l'aide de nombreuses autres personnes. Un apport humain qui se révèle tout aussi important que l'aide scientifique.

J'aimerai commencer logiquement par remercier ceux qui ont jugé mon travail et m'ont remis le grade de Docteur. Merci à **Sébastien Duperron**, rapporteur et président de ma soutenance et merci à **Peter Mergaert**, second rapporteur, pour leurs rapports précis et particulièrement pertinents. Merci à **Oliver Duron**, examinateur. Je pouvais difficilement avoir un meilleur jury. C'était un honneur. Malgré le stress, j'ai pris du plaisir à soutenir ma thèse. Les questions étaient passionnantes et parfois, ont tourné en discussion, que j'aurais pu prolonger encore de longues minutes s'il le fallait.

Je tiens aussi à remercier les membres de mon comité de suivi individuel (CSI) à savoir **Maryline Uzest**, **Christine Braquart-Varnier** et **Frédéric Gressent**. Nous nous sommes vus 3 fois seulement, mais chaque fois c'était un réel plaisir. J'ai ressenti votre intérêt, votre bienveillance, votre plaisir de voir mes travaux progresser. Vos conseils et remarques ont été précieux, merci pour tout.

Merci aussi aux collaborateurs externes avec qui j'ai eu la chance de travailler. Merci à **Patrick Callaerts** pour tes conseils précieux, ainsi qu'à **Cissy Huygens**. Aussi un grand merci à **François Renoz**, pour tes conseils nos discussions autant scientifiques que informelles, nos moments ensemble et pour la confiance que tu m'as donnée pour t'aider dans tes projets. J'espère qu'on aura l'occasion de collaborer ensemble dans le futur.

Un immense merci maintenant à ceux qui m'ont fait confiance et qui m'ont donné cette magnifique opportunité de réaliser cette thèse passionnante. Je parle évidemment de **Pedro Da Silva**, **Federica Calevro** et **Mélanie Ribeiro-Lopes**, mes encadrants. Je me rappelle comme si c'était hier de l'entretien que j'ai passé. Du coup de fil de Pedro, alors que j'étais en voiture me disant que si je le souhaitais toujours, ils seraient heureux de m'accueillir. J'avais d'autres opportunités, mais j'ai peu hésité. Au-delà du sujet qui évidemment me passionnait, c'est ce premier entretien qui m'a aussi convaincu : j'ai senti que j'avais à faire à des personnes profondément humaines. Et ce sentiment s'est plus que confirmé par la suite.

Merci à toi **Pedro**, pour ton soutien sans faille, pour ta pédagogie concernant la biochimie et la structure des protéines. Merci aussi pour ta manière d'être : toujours calme, toujours prêt à trouver une solution plutôt qu'un problème, à voir le côté positif. Cet optimisme constant m'a vraiment aidé à me détendre dans certains moments stressants de ma thèse. Et merci de m'avoir renouvelé ta confiance pour la suite !

Merci à toi **Fede**, pour tout. Tu es sans aucun doute la personne grâce à qui j'ai le plus muri scientifiquement. D'abord, je sais que je ne suis pas le plus bavard, mais je sais aussi que ta porte est ouverte si j'ai besoin, presque n'importe quand. Et c'est vrai encore aujourd'hui. Tu t'investi énormément pour que je puisse donner le meilleur de ce que j'ai. Ta rigueur scientifique permet l'excellence. Merci. Et tu ne m'as pas seulement appris à être un bon scientifique, tu m'as

Thèse accessible à l'adresse : https://theses.insa-lyon.fr/publication/2025ISAL0089/these.pdf © [H. Terrasson], [2025], INSA Lyon, tous droits réservés

aussi appris le fonctionnement du monde scientifique au sens plus large. Bref, j'ai grandi aussi grâce à toi.

J'aimerais aussi vous remercier tous les deux pour tous les congrès que j'ai pu faire, les voyages les, récompenses, les gens que vous m'avez fait rencontrer, et l'accueil que vous m'avez donné. Il est certains qu'on aura des occasions de se revoir !

Merci à toi **Mélanie**, c'était un plaisir et un honneur de t'avoir comme encadrante ! Quand parfois, je n'ai pas osé aller voir les directeurs de thèses, c'est Mélanie qui est là pour m'écouter, donner des conseils plus que précieux et pour rassurer. Scientifiquement, tu n'as à rougir d'aucun chercheur que j'ai rencontré au cours de ma thèse. Humainement, j'ai rarement rencontré quelqu'un d'aussi bienveillant. Et puis, je suis obligé de te remercier encore pour cette sortie au Japon. Je me suis laissé porter, et ton organisation impeccable, m'a permis de passer le plus beau séjour de ma vie jusqu'à maintenant. Tu sais tout le bien que je pense de toi, merci pour tout, sans toi cette thèse n'aurait pas été aussi cool à vivre.

Je veux dire un merci tout particulier à **Karen Gaget**. Tu ne faisais pas parti de mes encadrants, mais en vrai, c'est tout comme. Tu m'as appris telleeeeement de chose que je ne vais pas les énumérer ici. Tu sais tout faire et tu es plus pédagogue que tu l'imagines. Tu m'as accompagné dans la quasi intégralité de mes manip' et c'est grâce à ton talent et à ta bonne humeur (quasi) constante que j'y ai pris tant de plaisir ! Tu étais aussi derrière moi pour que je n'oublie rien (les élevages ! le cahier de labo !), ce qui m'a évité certains problèmes ! Merci à toi, t'es la meilleure !

Merci aussi à **Gabrielle Duport**, par qui j'ai eu la chance d'être formé sur la manipulation des pucerons avant ton départ à la retraite ! Merci à **Garance Lapetoule** qui a pris sa suite avec brio et avec toute ta joie de vivre ! (En plus t'es venu à ma soutenance alors que tu étais encore en congé maternité et ça m'a vraiment touché !). Merci aussi à **Aurélie Herbomez** qui m'a accompagné dans l'administratif, qui participe à la bonne ambiance du labo' et qui a toujours cherché à savoir si j'allais bien.

Maintenant je tiens à remercier **Carole Vincent-Monegat**, **Isabelle Rahioui** et **Séverine Balmand**. Vous m'avez toute trois accompagnés dans de nombreuses expériences, vous êtes chacune passionnée par votre domaine et ça se sent ! Merci Séverine qui partage ma passion de la microscopie, merci Isa qui m'a formé en biochimie, merci Carole pour certaines parties de biomol' mais aussi pour ton côté maternel avec moi ! On a très bien bossé, on s'est bien amusé, et ce n'est pas encore fini !

Je remercie aussi les non-permanents du laboratoire, pour les conseils précieux, les sorties en dehors du labo ou les discussions plus informelles, qui rassurent et permettent de savoir à quoi s'attendre. Merci à **Fatima Diya**, **Sylvain Benhamou**, **Auréline Lalouette** et un merci particulier à **Nikoletta Galambos** avec qui j'ai partagé le bureau pendant un certain temps, avec qui j'ai énormément discuté et avec qui j'ai pu aussi « improve my english » ! Plus tard, merci à Raphaël avec qui j'ai pu partager le bureau et pleins de moments

Merci aussi à tout le personnel de BF2i, pour votre accueille et tous ces moments dans la salle de pause, les pique-niques, les pots… etc. J'ai eu la chance d'être reçu durant ces années de thèse dans un laboratoire sain et dans lequel tout le monde s'entraide ! Merci à toutes et à tous ! C'était un plaisir de venir chaque jour, jamais je n'oublierai ces années.

Thèse accessible à l'adresse : https://theses.insa-lyon.fr/publication/2025ISAL0089/these.pdf © [H. Terrasson], [2025], INSA Lyon, tous droits réservés

De manière plus personnelle, je tiens ici à remercier ma famille et tous mes proches qui m'ont accompagné à distance, parfois proche de moi. Vous avez été au moins aussi important que tout le reste. Ce n'est pas ici que je vais m'étendre pour vous dire à quel point vous comptez et avez compté pour moi au cours de ma thèse, je vais juste dire que je suis fier de vous rendre fier. Merci aussi à ma colloc' Nana, qui m'a permis de me libérer l'esprit et de me rattacher au « monde réel » quand, à certains moments, au cours de la thèse, on peut en arriver à oublier qu'il y a aussi une vie autour.

Merci à celles et ceux qui liront cette thèse.

Thèse accessible à l'adresse : https://theses.insa-lyon.fr/publication/2025ISAL0089/these.pdf © [H. Terrasson], [2025], INSA Lyon, tous droits réservés

Thèse accessible à l'adresse : https://theses.insa-lyon.fr/publication/2025ISAL0089/these.pdf © [H. Terrasson], [2025], INSA Lyon, tous droits réservés

RESUME

Chez de nombreux insectes, la colonisation de milieux présentant des régimes alimentaires pauvres ou déséquilibrés repose sur des associations durables avec des bactéries symbiotiques capables de compléter leurs besoins nutritionnels. Ces symbioses nutritionnelles, particulièrement fréquentes chez les insectes Hémiptères, jouent un rôle central dans l'adaptation et la diversification évolutive de leurs hôtes. Ces symbiotes sont obligatoires et intracellulaires et sont hébergés dans des cellules spécialisées appelées bactériocytes. Chez les pucerons, ce symbiote nutritionnel ayant permis leur adaptation à la sève phloémienne des plantes est *Buchnera aphidicola*. La densité de cette bactérie est finement régulée en réponse aux besoins changeants de l'insecte. Chez d'autres insectes symbiotiques, plusieurs études ont montré que le système immunitaire, et notamment les peptides antimicrobiens (AMP), peuvent être détournés pour contrôler la densité ou la localisation des symbiotes. Chez les pucerons cette immunité humorale est fortement réduite et les mécanismes impliqués dans la régulation des symbiotes restent mal compris. Récemment, une famille de peptides riches en cystéines, exprimés spécifiquement dans les bactériocytes du puceron du pois *Acyrthosiphon pisum*, a été identifiée. Ces peptides « Bacteriocyte-specific Cysteine-Rich » (BCR) présentent une structure évoquant celle des défensines, une catégorie d'AMP, suggérant un rôle potentiel dans le contrôle de la symbiose. Cette thèse explore la diversité, la structure et la fonction de ces peptides. Une analyse de similarité de séquence (BLAST), couplée à des reconstructions phylogénétiques, a permis d'identifier 76 homologues des BCR présents uniquement chez les pucerons (Aphididae). Cette analyse a également montré la présence de quatre sous-familles distinctes de BCR, suggérant une possible diversification fonctionnelle. L'analyse structurale de BCR4, réalisée par résonnance magnétique nucléaire après synthèse et repliement du peptide, a révélé que ce peptide appartient à une nouvelle famille structurale de défensines. *In vitro*, BCR4 présente une activité bactéricide spécifique contre des bactéries à Gram négatif, phylogénétiquement proches du symbiote *B. aphidicola*. L'effet de l'ingestion de BCR4 a ensuite été évaluée chez trois lignées d'*A. pisum*, différant par leur fond génétique et par la présence ou non du symbiote facultatif *Regiella insecticola*. L'exposition à BCR4 entraîne une mortalité accrue, une réduction de la masse corporelle, un arrêt du développement embryonnaire, ainsi qu'une diminution drastique du nombre de symbiotes par rapport au contrôle. Ces résultats suggèrent une activité entomotoxique de BCR4, associée à une perturbation de la symbiose possiblement par un effet direct sur *Buchnera*, qui est plus sensible au traitement que *R. insecticola*. Enfin, grâce à un anticorps spécifique développé au cours de cette thèse, ce peptide a été localisé pour la première fois au niveau protéique dans les bactériocytes du puceron du pois. Des expériences d'immunohistochimie ont permis de déterminer la localisation subcellulaire de BCR4 à différents stades de développement. Le peptide forme un réseau dans tout le cytoplasme, autour des symbiotes, avec une organisation qui évoque celle du réticulum endoplasmique. Des « puncta » de BCR4 sont aussi observés dans le cytoplasme, suggérant un possible transport actif du peptide. Ces observations confirment la traduction effective du peptide et renforcent l'hypothèse d'une interaction directe avec *B. aphidicola*. En conclusion, cette thèse met en évidence un rôle probable de BCR4 dans la régulation de la symbiose chez le puceron. Elle suggère l'existence, chez les pucerons, d'un système immunitaire alternatif reposant sur des peptides spécialisés, ouvrant de nouvelles perspectives sur l'évolution de l'immunité en lien avec le contrôle symbiotique chez les insectes.

MOTS-CLÉS : Bacteriocyte-specific Cysteine-Rich, Symbiose nutritionnelle, *Acyrthosiphon pisum*, *Buchnera aphidicola*, peptides antimicrobiens, bactériocytes

Thèse accessible à l'adresse : https://theses.insa-lyon.fr/publication/2025ISAL0089/these.pdf © [H. Terrasson], [2025], INSA Lyon, tous droits réservés

Thèse accessible à l'adresse : https://theses.insa-lyon.fr/publication/2025ISAL0089/these.pdf © [H. Terrasson], [2025], INSA Lyon, tous droits réservés

TABLE DES MATIERES

REMERCIEMENTS **5**

RESUME **9**

TABLE DES MATIERES **11**

LISTE DES ABREVIATIONS **13**

LISTE DES TABLEAUX ET FIGURES **17**

AVANT-PROPOS **21**

INTRODUCTION **25**

1 LA SYMBIOSE CHEZ LES INSECTES **25**

1.1 Les symbioses nutritionnelles *25*

1.2 Autres rôles des symbiotes des insectes *40*

1.3 Tropisme et transmission des symbiotes *44*

2 DYNAMIQUE DES SYMBIOTES **53**

2.1 Le coût de la symbiose *53*

2.2 La densité symbiotique fluctue en fonction des besoins de l'hôte *54*

2.3 Stabilité du microbiote intestinal *58*

3 COMMENT LES SYMBIOTES SONT-ILS REGULES ? **61**

3.1 Les peptides antimicrobiens chez les insectes : voies immunitaires et rôles universels *62*

3.2 Rôle des peptides antimicrobiens dans le contrôle des symbiotes *72*

4 REGULATION DES SYMBIOTES CHEZ LES PUCERONS **82**

4.1 Régulation des symbiotes facultatifs *82*

4.2 Dynamique de régulation des bactérioytes et de Buchnera dans les lignées mono-symbiotiques *83*

4.3 Les peptides « Bacteriocytes-specific Cysteine-Rich (BCR) » chez le puceron du pois *88*

OBJECTIFS DE LA THESE **93**

CHAPITRE 1 LES BCR CONSTITUENT UNE NOUVELLE FAMILLE DE DEFENSINES A ACTIVITE ENTOMOTOXIQUE : FOCUS SUR BCR4 ..... **95**

Article 1 : Aphid BCR4 Structure and Activity Uncover a New Defensin Peptide Superfamily *98*

CHAPITRE 2 ETUDE DES EFFETS TOXIQUES DE BCR4 ..... **116**

Article 2 : Strong impact of orally administered BCR4 defensin on aphid survival, embryo development and symbiotic cells in three Acyrthosiphon pisum parthenogenetic lines. *119*

Thèse accessible à l'adresse : https://theses.insa-lyon.fr/publication/2025ISAL0089/these.pdf © [H. Terrasson], [2025], INSA Lyon, tous droits réservés

CHAPITRE 3 CARACTERISATION DE LA LOCALISATION SPATIO-TEMPORELLE DE BCR4 AU SEIN DES BACTERIOCYTES 135

1 CONTEXTE DE L'ETUDE 135

2 MATERIELS ET METHODES 137

2.1 Élevage des pucerons 137

2.2 Production des anticorps anti-BCR4 137

2.3 Test des anticorps contre BCR4 synthétique en western blot 138

2.4 Dissection des bactériocytes 139

2.5 Test des anticorps contre un extrait protéique de pucerons 139

2.6 Immunohistochimie sur coupe 140

2.7 Immunohistochimie sur bactériocytes entiers 141

3 RESULTATS 143

3.1 Détection de BCR4 synthétique et BCR4 endogène en western blot 143

3.2 Localisation subcellulaire de BCR4 dans les bactériocytes en fonction du stade de développement 145

4. DISCUSSION 151

DISCUSSION GENERALE 154

Diversité des BCR chez les pucerons : synonyme de diversification fonctionnelle ? 154

BCR4 : une nouvelle famille structurale et une activité antimicrobienne spécifique ... 158

BCR4 altère la survie, le développement et la symbiose du puceron 159

Confirmation de la présence de BCR4 par spectrométrie de masse 164

Localisation subcellulaire de BCR4 dans les bactériocytes : une proximité étroite avec B. aphidicola 165

Relations entre le réticulum endoplasmique et BCR4 166

Relations entre BCR4, le cytosquelette et les « sheat cells » 168

BCR4, voie d'adressage et rôle possible 170

CONCLUSION ET PERSPECTIVES 175

Un rôle dans l'immunité ? 175

Expériences d'inactivations fonctionnelles des BCR 176

Quels sont les protéines partenaires des BCR ? 177

BIBLIOGRPAHIE 179

CURRICULUM VITAE 199

ANNEXES 204

Thèse accessible à l'adresse : https://theses.insa-lyon.fr/publication/2025ISAL0089/these.pdf © [H. Terrasson], [2025], INSA Lyon, tous droits réservés

LISTE DES ABREVIATIONS

ADN = Acide désoxyribonucléique

AMP = Peptide antimicrobien (*Antimicrobial peptide*)

AP-1 = *Activator protein-1*

APSE = *Acyrthosiphon pisum* secondary endosymbiont

APV = Virus de *Acyrthosiphon pisum*

ARN = Acide ribonucléique

ARNt = Acide ribonucléique de transfert

ATP = Adénosine triphosphate

bacA = *bacterioid differencation A*

BCR = *Bacteriocyte-specific cysteine-rich*

CCR = *Crypt-specific cysteine-rich*

ColA = Coléoptéricine A

DAP = Acide diaminopimélique (*Diaminopimelic acid*)

Dif = *Dorsal-related immunity factor*

Dom = *Domeless*

Dredd = *Death-related ced-3/Nedd2-like protein*

FADD = *Fas-associated protein with death domain*

GNBP = *Gram-negative binding proteins*

GOGAT = *Glutamine-oxoglutarate aminotransferase*

GroEL = *Growth-related Escherichia coli large subunit*

GRP = Peptide riche en glycine (*Glycine-rich peptide*)

Hep = *Hemipterous*

Hop = *Hopscotch*

Thèse accessible à l'adresse : https://theses.insa-lyon.fr/publication/2025ISAL0089/these.pdf © [H. Terrasson], [2025], INSA Lyon, tous droits réservés

IMD = *Immune-deficiency*

Ird5 = *Immune response deficient 5*

IRLC = *Inverted repeat–lacking clade*

JAK/STAT = *Janus kinase/Signal transducer and activator of transcription*

JNK = *c-Jun N-terminal kinase*

Jra1 = *Jun-related antigen 1*

Kay = *Kayak*

MS = Spectrométrie de masse (*Mass spectrometry*)

NADH = Nicotinamide adénine dinucléotide réduit

NCR = *Nodule-specific cysteine-rich*

NF-κB = *Nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells*

Nod = Nodulation

PAMP = *Pathogen-associated molecular pattern*

PGRP = *Peptidoglycan recognition protein*

PGRP-LX = *Peptidoglycan recognition protein – long cytoplasmic tail, isoform X*

PGRP-SX = *Peptidoglycan recognition protein – short cytoplasmic tail, isoform X*

PI = Iodure de propidium (*Propidium iodide*)

PO = Phénoloxydase

proPO = Prophénoloxydase

PRR = Récepteur de reconnaissance de motifs (*Pattern recognition receptor*)

RE = Réticulum endoplasmique

RNAi = Interférence par ARN (*RNA interference*)

RNA-seq = Séquençage de l'ARN (*RNA sequencing*)

ROS = Espèces réactives de l'oxygène (*Reactive oxygen species*)

SbmA = *Sensitivity to bacteriocin microcin B17 A*

Thèse accessible à l'adresse : https://theses.insa-lyon.fr/publication/2025ISAL0089/these.pdf © [H. Terrasson], [2025], INSA Lyon, tous droits réservés

Soldalis sp. PSPU = *Soldalis sp.* de *Philaenus spumarius*

SPC = *Signal peptidase complex*

Stat92E = *Signal transducer and activator of transcription at 92E*

Tab = *Tak-binding protein*

Tak = *Transforming growth factor-beta activated kinase 1*

TCT = *Tracheal cytotoxin*

Upd = *Unpaired*

urm1 = *Ubiquitin-related modifier 1*

wCle = *Wolbachia* de *Cimex lectularius*

Thèse accessible à l'adresse : https://theses.insa-lyon.fr/publication/2025ISAL0089/these.pdf © [H. Terrasson], [2025], INSA Lyon, tous droits réservés

Thèse accessible à l'adresse : https://theses.insa-lyon.fr/publication/2025ISAL0089/these.pdf © [H. Terrasson], [2025], INSA Lyon, tous droits réservés

LISTE DES TABLEAUX ET FIGURES

Figure 1 : Distribution phylogénétique et localisation cellulaire des endosymbiotes chez les insectes hémiptères et autres ordres d'insectes sélectionnés. 28

Figure 2 : La phylogénie comparée entre les Aphididae et *Buchnera* révèle une étroite cospéciation entre les deux partenaires symbiotiques. 29

Figure 3 : Intégration métabolique des voies de biosynthèse de la phénylalaline, tyrosine, valine, leucine et isoleucine entre le puceron du pois *Acyrthosiphon pisum* et son symbiote *Buchnera aphidicola*. 31

Figure 4 : Aperçu du processus de réduction génomique chez les endosymbiotes. 33

Figure 5 : Complémentation métabolique des symbiotes co-obligatoires chez les Aphididae. 34

Figure 6 : Principales différences entre les métabolismes des holobiontes d'*A. pisum* et de *S. maydis*. 35

Figure 7 : Résumé des acquisitions et pertes de symbiotes héritables chez les insectes suceurs de sève de l'ordre des Hémiptères. 37

Figure 8 : Diversité de tropisme bactériocytaire des endosymbiotes obligatoires, co-obligatoires et facultatifs chez les hémiptères. 46

Figure 9 : Représentation schématique de la structure de l'ovaire et de la transmission de *Buchnera* chez des pucerons ovipares et vivipares. 48

Figure 10 : Dynamiques d'infection de *Buchnera* et *Serratia* au cours du cycle de vie parthénogénétique d'*Acyrthosiphon pisum* 49

Figure 11 : Evolution de la quantité de symbiote chez le puceron du pois et le charançon des céréales en fonction du développement 56

Figure 12 : Récapitulatif des voies immunitaires humorales responsables de l'expression des peptides antimicrobiens chez les insectes 63

Figure 13 : Voie immunitaire IMD dégradée chez onze espèces de puceron 68

Figure 14 : Voie immunitaire IMD et des AMP chez les Hémiptères et les Thysanoptères 70

Figure 15 : Intestin moyen disséqué de *Riptortus pedestris* trois jours après la mue du cinquième stade. 72

Figure 16 : Différenciation des rhizobiums endosymbiotiques induite par les peptides NCR dans les cellules nodulaires des légumineuses 76

Figure 17 : Mécanismes proposés de la réponse au défi TCT au sein des bactériomes de *S. oryzae* 80

Figure 18 : Le réticulum endoplasmique à l'origine de l'hypervacuolisation des bactériocytes dégénératifs 84

Figure 19 : Observation en microscopie électronique à transmission (MET) de bactériocytes dégénératifs chez *A. pisum* 85

Figure 20 : Activation du système lysosomal au cours de la dégénérescence des bactériocytes chez le puceron. 86

Figure 21 : Profil spatio-temporel d'expression des gènes BCR chez *A. pisum* 89

Figure 22 : Structures primaires des BCR du puceron du pois 90

Thèse accessible à l'adresse : https://theses.insa-lyon.fr/publication/2025ISAL0089/these.pdf © [H. Terrasson], [2025], INSA Lyon, tous droits réservés

Figure 23 : Mécanismes d'action des peptides antimicrobiens sur les membranes bactériennes 91

Figure 24 : Stades de développement du pucerons du pois en fonction du temps.....137

Figure 25 : Détection de BCR4 synthétique par les anticorps anti-BCR4 en western blot 143

Figure 26 : Détection de BCR4 par les anticorps anti-BCR4 en westernblot, à partir d'un extrait protéique de bactériocyte d'*A. pisum* âgés de 9 jours. 144

Figure 27 : Immunolocalisation du peptide BCR4 sur coupe de puceron A9. 145

Figure 28 : Localisation subcellulaire de BCR4 et *Buchnera* dans les bactériocytes d'*A. pisum*, en fonction du développement 147

Figure 29 : Localisation subcellulaire de BCR4 en lien avec l'organisation du réticulum endoplasmique dans les bactériocytes d'*A. pisum* en fonction du développement 148

Figure 30 : : Comparaison entre la localisation de BCR4 et le réticulum endoplasmique dans les bactériocytes de pucerons sénescents.....149

Figure 31 : : Localisation subcellulaire de BCR4 en lien avec l'organisation du cytosquelette dans les bactériocytes d'*A. pisum* en fonction du développement 150

Figure 32 : Répartition des gènes BCR le long du chromosome A1 d'*Acyrthosiphon piusm* 156

Figure 33 : Identification et dénombrement des symbiotes par cytométrie en flux chez trois lignées d'*Acyrthosiphon pisum* 161

Figure 34 : Détection immuno-histologique de molécule dans les bactériocytes de *Myzus persicae* suite à leur ingestion 162

Figure 35 : Présence de BCR4 dans les sheath cells d'un bactériocycte d'*Acythosiphon pisum*.....169

Figure 36 : Hypothèses sur de la voie d'adressage du peptide BCR4 dans les bactériocytes du puceron *Acyrthosiphon pisum* et de ses fonctions possibles dans la symbiose 173

Tableau 1 : Détection de BCR4 endogène dans les extraits protéiques bactériocytaires par spéctrométrie de masse.....144

Thèse accessible à l'adresse : https://theses.insa-lyon.fr/publication/2025ISAL0089/these.pdf © [H. Terrasson], [2025], INSA Lyon, tous droits réservés

Thèse accessible à l'adresse : https://theses.insa-lyon.fr/publication/2025ISAL0089/these.pdf © [H. Terrasson], [2025], INSA Lyon, tous droits réservés

Thèse accessible à l'adresse : https://theses.insa-lyon.fr/publication/2025ISAL0089/these.pdf © [H. Terrasson], [2025], INSA Lyon, tous droits réservés

AVANT-PROPOS

Le terme « symbiose » désigne une association durable entre deux organismes d'espèces différentes, caractérisée par une proximité physique plus ou moins étroite, indépendamment de ses effets sur la fitness des partenaires (de Bary, 1879). Ces interactions couvrent un *continuum* allant du mutualisme au parasitisme, en passant par des états intermédiaires comme le commensalisme. Les relations symbiotiques peuvent évoluer le long de ce spectre au fil du temps ou selon les conditions environnementales, modifiant ainsi les bénéfices et les coûts relatifs pour chaque partenaire (Drew *et al.*, 2021). Dans certaines de ces alliances, les partenaires deviennent si intimement liés qu'ils finissent par fonctionner comme un seul et même système biologique.

Parmi les formes les plus fascinantes de ce *continuum*, la symbiose mutualiste nutritionnelle se distingue par son rôle déterminant dans l'accès à de nouvelles niches écologiques (Mestre *et al.*, 2020). Elle permet à des hôtes d'exploiter des régimes alimentaires pauvres ou déséquilibrés en s'associant à des microorganismes capables de compléter leur nutrition (Douglas & Emden, 2007 ; Douglas, 2009). Ces symbiotes apportent les éléments indispensables absents de l'environnement nutrionnel, comme des acides aminés essentiels, des vitamines ou des cofacteurs, souvent au prix d'une spécialisation poussée et d'une interdépendance métabolique marquée (McCutcheon & Moran, 2007 ; Wilson *et al.*, 2010).

Chez les insectes, ces symbioses nutritionnelles ont joué un rôle clef dans leur diversification évolutive (Vavre & Kremer, 2014 ; Bennett *et al.*, 2024). Elles sont particulièrement répandues chez les Hémiptères, un ordre riche en espèces phytophages vivant de la sève, du bois ou d'autres ressources appauvries. Ces insectes hébergent leurs symbiotes dans des cellules spécialisées appelées bactériocytes, au sein desquelles se tissent des relations complexes d'échange et de régulation (Buchner, 1965 ; Baumann, 2005).

Parmi eux, le puceron du pois, *Acyrthosiphon pisum*, constitue un modèle emblématique. En symbiose obligatoire (cf. encadré « Définitions ») avec *Buchnera aphidicola* depuis environ 150 millions d'années (Moran *et al*., 1997), ce couple symbiotique est l'un de plus étudiés au niveau métabolique, et

Thèse accessible à l'adresse : https://theses.insa-lyon.fr/publication/2025ISAL0089/these.pdf © [H. Terrasson], [2025], INSA Lyon, tous droits réservés

est devenu un vrai modèle en génomique des interactions depuis le séquençage des génomes des deux partenaires symbiotiques (Shigenobu *et al.*, 2000 ; IAGC, 2010). Par ailleurs, le puceron du pois a aussi été le premier insecte hémimétabole, mais également le premier insecte symbiotique, dont le génome a été séquencé. Cependant, même si très étudié, de nombreuses questions restent en suspens quant au fonctionnement de ce couple symbiotique : comment le puceron régule-t-il la symbiose intracellulaire avec *B. aphidicola* ? Quels mécanismes lui permettent de maintenir l'équilibre entre soutien métabolique et contrôle immunitaire, sans déclencher une réponse délétère envers son partenaire obligatoire ?

C'est à ces questions qu'entend répondre ce travail de thèse, en se focalisant sur une famille de peptides récemment découverte chez le puceron : les Bacteriocyte-specific Cysteine-Rich peptides (BCR) (Shigenobu & Stern, 2013). Leur expression strictement bactériocytaire, leurs propriétés structurelles proches de celles des défensines et leur activité antimicrobienne suggèrent un rôle inédit dans la régulation fine des symbiotes intracellulaires.

Thèse accessible à l'adresse : https://theses.insa-lyon.fr/publication/2025ISAL0089/these.pdf © [H. Terrasson], [2025], INSA Lyon, tous droits réservés

Définitions des différents types de symbiotes

Lorsqu'on s'intéresse à la littérature traitant de la symbiose chez les insectes, on se heurte rapidement à une diversité de termes utilisés pour qualifier les symbiotes en fonction de leur rôle et/ou de l'ancienneté de l'association avec leur hôte. Les expressions « symbiote primaire » et « symbiote obligatoire » sont utilisés comme étant équivalente. Par contre, il peut exister de la confusion entre les termes « symbiote co-obligatoire », « symbiote secondaire » et « symbiote facultatif », souvent utilisés de manière interchangeable, en fonction de l'année de publication, des auteurs ou du modèle biologique étudié. Afin de lever toute ambiguïté, je proposerai ici les définitions de ces termes telles que je les utiliserai dans ce manuscrit, en m'appuyant sur l'usage qu'en font certains auteurs ayant abordés la question comme Sloan & Moran (2012a), Douglas (2016) ou Renoz et al. (2024) :

***Symbiote primaire (ou obligatoire)** : symbiote systématiquement présent chez son hôte et indispensable à son développement, à sa survie et/ou à sa reproduction. Il assure généralement des fonctions métaboliques essentielles ;*

***Symbiote secondaire** : symbiote présent en plus du symbiote obligatoire. Un même symbiote secondaire peut être co-obligatoire ou facultatif selon l'espèce ou la population hôte considérée ;*

- ***Symbiote co-obligatoire** : symbiote systématiquement présent chez son hôte, et indispensable à son développement, à sa survie et/ou à sa reproduction. Il complète les fonctions métaboliques essentielles absentes ou altérées chez le symbiote primaire. Lorsque le symbiote primaire est fixé à l'échelle d'un taxon, l'identité du symbiote co-obligatoire lui peut varier. Sa fixation dans les populations hôtes a eu lieu après la fixation du symbiote primaire ;*
- ***Symbiote facultatif** : symbiote non systématiquement présent chez son hôte, dont les fonctions, les effets et les bénéfices apportés à l'hôte peuvent varier selon les conditions environnementales. Son absence n'empêche pas l'hôte de se développer, de survivre et de se reproduire.*

Thèse accessible à l'adresse : https://theses.insa-lyon.fr/publication/2025ISAL0089/these.pdf © [H. Terrasson], [2025], INSA Lyon, tous droits réservés

Thèse accessible à l'adresse : https://theses.insa-lyon.fr/publication/2025ISAL0089/these.pdf © [H. Terrasson], [2025], INSA Lyon, tous droits réservés

1 La symbiose chez les insectes

1.1 Les symbioses nutritionnelles

De nombreux insectes se nourrissent exclusivement de milieux dits déséquilibrés, car ceux-ci ne contiennent pas les concentrations optimales d'un ou plusieurs nutriments essentiels à leur croissance, leur développement et leur reproduction. La colonisation de telles niches écologiques n'est rendue possible que grâce l'association de ces insectes avec des bactéries bénéfiques (Akman Gündüz & Douglas, 2009). En effet, ces symbiotes apportent à leurs hôtes les composés présents en faibles quantités dans leurs milieux nutritionnels (revues : Douglas, 1998 ; Baumann, 2005 ; Hansen & Moran, 2014 ; Douglas, 2016 ; Kaltenpoth *et al.*, 2025).

Ces systèmes de symbioses nutritionnelles reposent sur une interdépendance métabolique poussée entre l'hôte et son symbiote, chacun complétant les lacunes métaboliques de l'autre (Baumann *et al.*, 1995 ; Douglas, 2003, 2009). Cette interdépendance se traduit par une division génétique des voies métaboliques : le symbiote conserve des gènes nécessaires à la production des nutriments essentiels pour l'hôte, tandis que ce dernier prend en charge certaines fonctions métaboliques absentes chez son ou ses symbiotes.

Même si toutes les symbioses nutritionnelles sont caractérisées par une interdépendance métabolique entre hôte et symbiote, le degré d'interdépendance varie selon l'ancienneté de l'association. Dans les symbioses anciennes, cette interdépendance est tellement poussée que certaines voies métaboliques sont codées en partie par l'hôte et en partie par le symbiote. Des exemples connus sont les biosynthèses de la phénylalanine et de la tyrosine chez le puceron du pois, *Acyrthosiphon pisum*, dont une partie des gènes sont codés par le génome de son symbiote *Buchnera aphidicola* (Shigenobu *et al.*, 2000 ; Wilson *et al.*, 2010, Rabatel *et al.*, 2013, Simonet *et al.*, 2016a). De plus l'interdépendance

Thèse accessible à l'adresse : https://theses.insa-lyon.fr/publication/2025ISAL0089/these.pdf © [H. Terrasson], [2025], INSA Lyon, tous droits réservés

entre hôte et symbiote perdure pendant tout le cycle de vie de l'insecte (Simonet *et al.*, 2016b). Dans les symbioses plus récentes, le partage des voies métaboliques est moins fréquent, et l'interdépendance ne concerne qu'une partie de la vie de l'insecte, comme dans la symbiose entre le charançon des céréales, *Sitophilus oryzae* et son symbiote *Sodalis pierantonius* (Vigneron *et al.*, 2014).

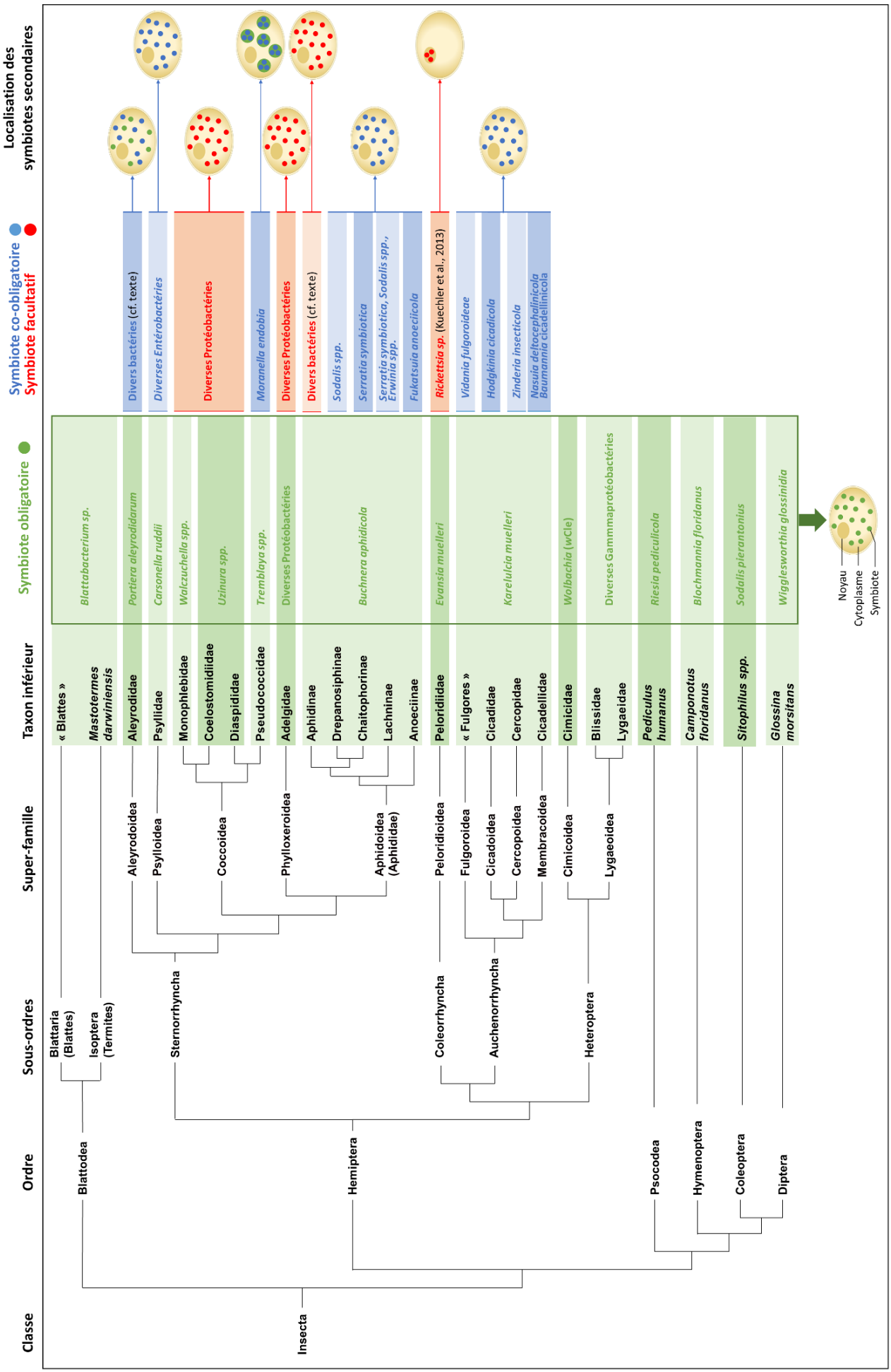
Cette interdépendance métabolique a été rendue possible par la ségrégation des symbiotes dans des cellules spécialisées de l'hôtes, les bactériocytes (Buchner, 1965 ; Baumann, 2005). Ces cellules, qui sont présentes dans pratiquement tous les insectes symbiotiques, protègent le symbiote du système immunitaire de l'hôte (Masson *et al.*, 2015 ; Ferrarini *et al.*, 2022) et sont au cœur des échanges métaboliques entre hôtes et symbiotes (Nakabachi *et al.*, 2005 ; Hansen & Moran, 2011, 2014).

1.1.1 Les Hémiptères, un ordre privilégié pour étudier la symbiose nutritionnelle

Les hémiptères forment un ordre d'insectes divisé en quatre sous-ordres (Sternorrhyncha, Auchenorrhyncha, Coleorrhyncha et Heteroptera). Cet ordre comprend environ 100 000 espèces, dont la majorité sont phytophages, bien que certains hétéroptères soient hématophages (Song *et al.*, 2024). Parmi ces espèces, on retrouve notamment les pucerons, cigales, punaise, aleurodes, cochenilles, cécropes et psylles. C'est dans cet ordre d'insectes, qui remonte à plus de 350 millions d'années (Misof *et al.*, 2014 ; Song *et al.*, 2024), que les symbioses nutritionnelles sont plus largement étudiées dans leur diversité. L'ensemble des sous-familles constituant les trois premiers sous-ordres (Sternorrhyncha, Auchenorrhyncha et Coleorrhyncha) comprend des espèces hébergeant des bactéries symbiotiques, tandis que des associations similaires, bien que moins fréquentes, sont également observées chez certains Hétéroptères (**Figure 1**).

Cette remarquable diversité d'associations symbiotiques, couplée à la vaste diversité taxonomique, écologique et morphologique des hémiptères, en fait un groupe particulièrement propice à l'étude de la symbiose chez les insectes. Leurs symbiotes obligatoires, logés dans des bactériocytes, présentent des degrés variés d'intégration et de coévolution, allant d'associations anciennes et stables à des systèmes ayant subi des remplacements évolutifs récents (Koga *et al.*, 2013 ; Bennett & Moran, 2015). Certains groupes hébergent un unique partenaire

Thèse accessible à l'adresse : https://theses.insa-lyon.fr/publication/2025ISAL0089/these.pdf © [H. Terrasson], [2025], INSA Lyon, tous droits réservés



Thèse accessible à l'adresse : https://theses.insa-lyon.fr/publication/2025ISAL0089/these.pdf © [H. Terrasson], [2025], INSA Lyon, tous droits réservés

Figure 1 : Distribution phylogénétique et localisation cellulaire des endosymbiotes chez les insectes hémiptères et autres ordres d'insectes sélectionnés. La partie inférieure de la figure illustre une phylogénie simplifiée des insectes, construite à partir des travaux de Misof *et al.* (2014) pour l'ensemble des Insectes, de Song *et al.* (2024) pour les Hémiptères, et de Jousselin *et al.* (2024) pour les Aphididae. La partie supérieure de la figure détaille les associations symbiotiques observées dans les familles représentées, en se concentrant uniquement sur les endosymbiotes intracellulaires hébergés dans des bactériocytes. Les symbiotes obligatoires (en vert) sont présents dans tous les individus d'un taxon donné et assurent généralement des fonctions nutritionnelles essentielles. Les symbiotes co-obligatoires (en bleu) complètent les fonctions perdues chez le symbiote principal et participent à la complémentation métabolique. Les symbiotes facultatifs (en rouge) peuvent être absents de certains individus ou populations et confèrent souvent des avantages contextuels (résistance thermique, protection contre les parasitoïdes, etc.). Les symbiotes co-obligatoires et facultatifs ne sont pas présent dans l'ensemble des espèces d'un même taxon. Enfin, la partie la plus haute représente la localisation du symbiote primaire par rapport aux symbiotes co-obligatoires ou facultatifs, inspiré de la représentation faite par Douglas, (2016) (cf partie 1 de l'introductiontraitant du tropisme des symbiotes).

principal, tandis que d'autres entretiennent des associations plus complexes impliquant plusieurs symbiotes, parfois issus de lignées phylogénétiquement très éloignées et aux fonctions métaboliques complémentaires (Douglas, 2016). Cette diversité de systèmes symbiotiques offre une opportunité unique pour comparer les mécanismes cellulaires, physiologiques et évolutifs impliqués dans l'établissement et la diversification des symbioses nutritionnelles chez les insectes.

Parmi les hémiptères, les Aphididae (appelés par leur nom vernaculaire « pucerons » dans le reste de ce manuscrit) occupent une place particulière en tant que modèles d'étude, initialement pour des raisons qui dépassent largement le seul cadre de la symbiose. Leur cycle de vie atypique, alternant reproduction sexuée et parthénogenèse, ainsi que leur remarquable plasticité phénotypique, en font un système de choix pour explorer les mécanismes liés aux développements et à l'adaptation chez les insectes (Calevro *et al.*, 2019). Sur le plan agronomique, les pucerons comptent parmi les ravageurs les plus redoutés : ils sont capables de coloniser plus de 25 % des espèces végétales, y compris les six principales cultures destinées à la consommation humaine (Dedryver *et al.*, 2010). Leur impact est renforcé par leur capacité à transmettre un grand nombre de phytovirus, plus de 375 virus différents, représentant à eux seuls près de 30 % des virus phytopathogènes connus (Hogenhout *et al.*, 2008).

Thèse accessible à l'adresse : https://theses.insa-lyon.fr/publication/2025ISAL0089/these.pdf © [H. Terrasson], [2025], INSA Lyon, tous droits réservés

1.1.2 *Cas d'étude : la symbiose entre* Acyrthosiphon pisum *et* Buchnera aphidicola. *Complémentation métabolique et réduction du génome du symbiote*

La quasi-totalité des 5 000 espèces de pucerons décrites sont des insectes piqueurs-suceurs qui se nourrissent de la sève phloémienne des plantes. Ce milieu est riche en sucre mais carencé en acides aminés essentiels (leucine, isoleucine, valine, méthionine, phénylalanine, histidine, lysine, thréonine et tryptophane), en composés azotés, en certaines vitamines B (notamment la riboflavine et la biotine) ainsi qu'en lipides et stérols (Douglas, 1993 ; Sandström & Pettersson, 1994). Chez les pucerons, le symbiote complémentant les carences de la sève phloémienne, est une gammaprotéobactérie phylogénétiquement proche *d'Escherichia coli* : *B. aphidicola*, qui est présente dans quasiment toutes les espèces (Buchner, 1965 ; Munson *et al.*, 1991) (**Figure 1**). La relation entre les pucerons et *B. aphidicola* est très ancienne, remontant à une période comprise entre 80 et 150 millions d'années (Moran *et al.*, 1993 ; von Dohlen & Moran, 2000). Cette association durable a donné vie à une vraie co-spéciation et coévolution des différentes souches de *Buchnera* avec leurs espèces hôtes (**Figure 2**). Parmi les pucerons, le puceron du pois *A. pisum* est certainement le

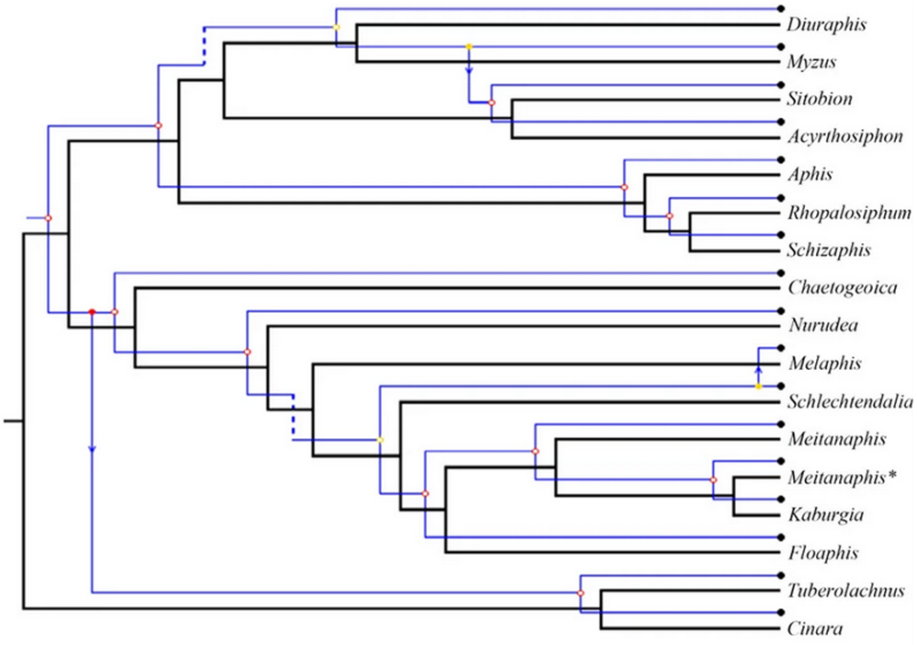


Figure 2 : La phylogénie comparée entre les Aphididae et *Buchnera* révèle une étroite cospéciation entre les deux partenaires symbiotiques. Les arbres noir et bleu indiquent respectivement les phylogénies du puceron (à l'échelle du genre) et de *Buchnera*. Les cercles rouges vides représentent des événements de co-diversification, tandis que les cercles rouges pleins et jaunes signalent des duplications. Les flèches indiquent des changements d'hôte, et les lignes pointillées correspondent à des événements de perte. *D'après Liang et al. (2024).*

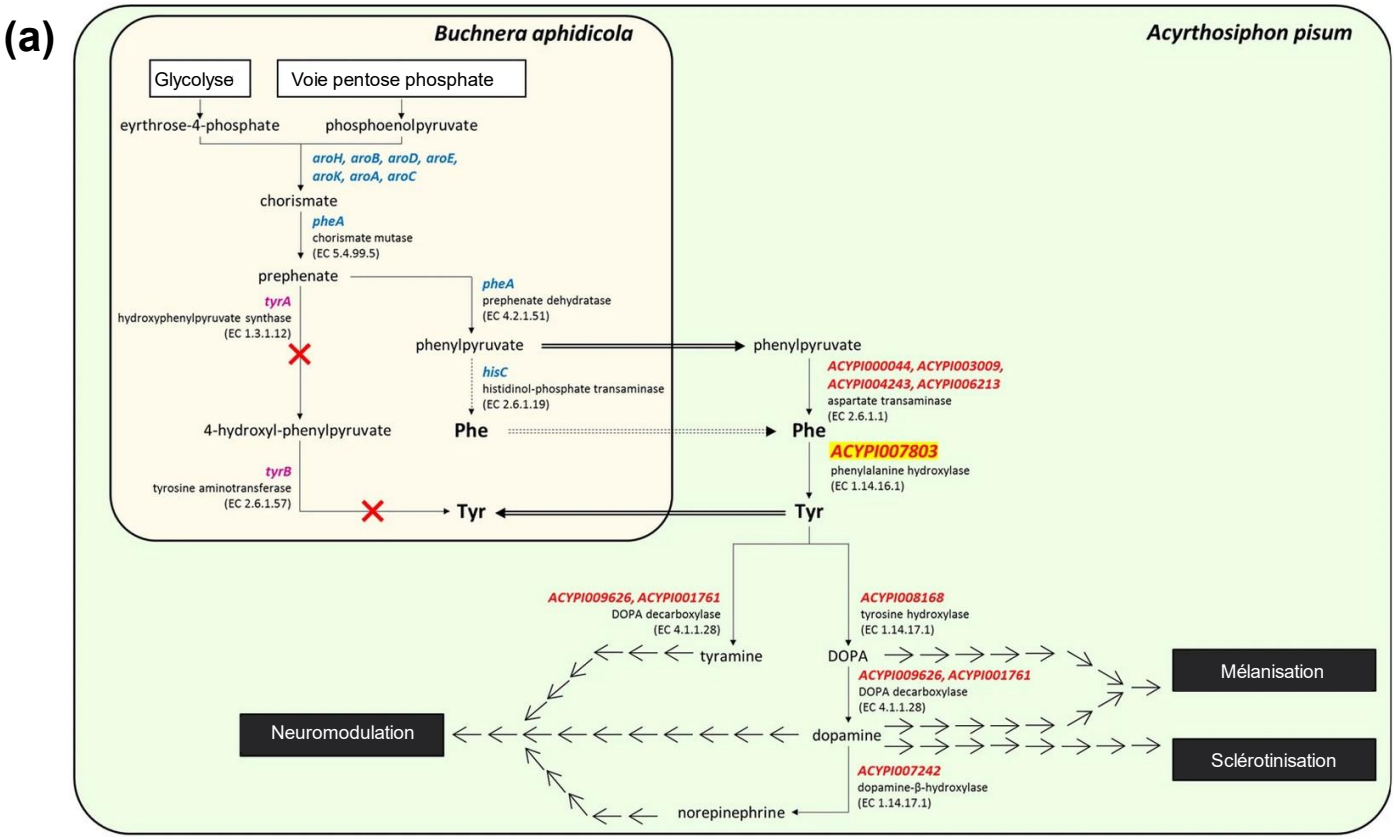
Thèse accessible à l'adresse : https://theses.insa-lyon.fr/publication/2025ISAL0089/these.pdf © [H. Terrasson], [2025], INSA Lyon, tous droits réservés

plus étudié. Ce puceron a une taille intéressante (3-5 mm pour des individus adultes) comparativement à d'autres espèces plus petites, est facilement manipulable, peut être élevé sur des milieux artificiels et maintenu en laboratoire en conditions de parthénogénèse vivipare (reproduction clonale) (IAGC 2010). Par conséquent, le symbiote primaire associé à *A. pisum* a été le plus étudié. Ce couple symbiotique a été le premier (tout organisme confondu) pour lequel les génomes de l'hôte et du symbiote ont été disponibles [en 2010 (IAGC, 2010) et en 2000 (Shigenobu *et al.*, 2000) respectivement]. Ainsi, le décryptage du dialogue moléculaire et métabolique établi entre les pucerons et leur symbiote obligatoire a servi d'exemple pour la compréhension du fonctionnement de l'ensemble des symbioses nutritionnelles chez les insectes.

Spécifiquement au modèle *Buchnera*/puceron du pois, bien que la bactérie conserve la majorité des gènes codant les enzymes impliquées dans la synthèse des acides aminés essentiels pour son hôte, il lui manque des gènes clés dans les voies de biosynthèses de la phénylalanine et de la tyrosine (citées plus haut ; **Figure 3a**) mais également de la leucine, l'isoleucine, la valine (**Figure 3b**) et la méthionine (Shigenobu *et al.*, 2000, Wilson *et al.*, 2011, Hansen & Moran 2011). Ces gènes manquants sont codés par le génome du puceron pour donner vie à un métabolisme fortement intégré (IAGC, 2011 ; Wilson *et al.*, 2011 ; Hansen & Moran, 2011 ; Rabatel *et al.*, 2013). Pour les acides aminés cités, les étapes de biosynthèses initiales sont plutôt prises en charges par le symbiote, tandis que les étapes terminales sont réalisées par l'hôte (**Figure 3**). De plus, l'hôte joue un rôle clé dans le recyclage de l'azote, en intégrant l'ammonium issu de son propre métabolisme *via* le cycle GOGAT (Glutamine-Oxoglutarate AminoTransférase) pour alimenter *Buchnera* en précurseurs nécessaires à la synthèse des acides aminés (Hansen & Moran, 2011).

Outre cette spécialisation dans la complémentation métabolique (10% du génome de *B. aphidicola* chez *A pisum* est consacré à la biosynthèse d'acides aminés, contre 2% chez *E. coli*), le génome de *B. aphidicola* est fortement réduit (600 kpb pour le symbiote du puceron du pois, contre 4.500 kpb pour *E. coli* de la souche K12). Il a notamment perdu un certain nombre de fonctions qui ne lui sont plus utiles dans sa vie intracellulaire et dans sa dépendance vis-à-vis de l'hôte.

Thèse accessible à l'adresse : https://theses.insa-lyon.fr/publication/2025ISAL0089/these.pdf © [H. Terrasson], [2025], INSA Lyon, tous droits réservés



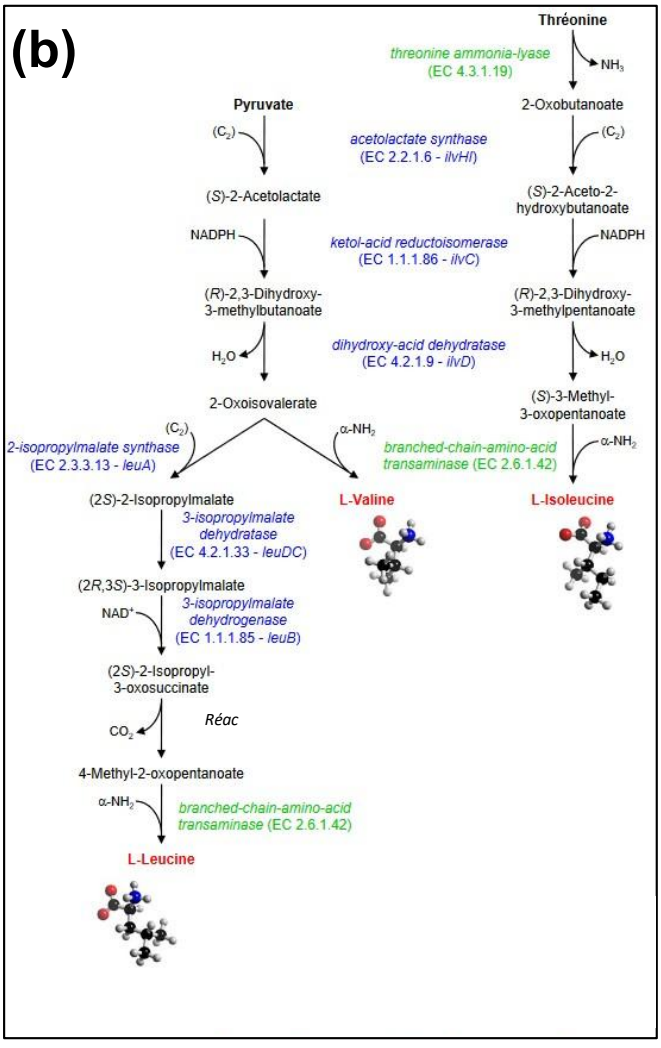


Figure 3 : Intégration métabolique des voies de biosynthèse de la phénylalaline, tyrosine, valine, leucine et isoleucine entre le puceron du pois *Acyrthosiphon pisum* et son symbiote *Buchnera aphidicola*. (a) Représentation schématique de la voie intégrée de biosynthèse de la tyrosine entre le puceron du pois (rectangle vert clair) et *Buchnera* (rectangle beige clair). Les enzymes sont indiquées par leurs numéros EC (Enzyme Commission) au niveau des réactions correspondantes : en rouge, les gènes codant des enzymes chez le puceron ; en bleu, les gènes codant des enzymes chez *Buchnera* ; en violet, les gènes absents chez *Buchnera*. Les flèches simples et doubles représentent respectivement les réactions métaboliques et les étapes de transport. Les flèches pleines indiquent des événements annotés, tandis que les flèches en pointillé correspondent à des événements possibles. L'inactivation de phénylalanine hydroxylase (surligné en jaune), une enzyme codée par le puceron et impliquée dans la conversion de la phénylalanine d'origine symbiotique en tyrosine, entraîne une carence en tyrosine, une accumulation de phénylalanine, et se traduit par une réduction de la fécondité, une altération du développement embryonnaire et une baisse de la survie, révélant la dépendance de *Buchnera* à l'hôte pour la production de tyrosine. Abréviations : Phe, phénylalanine ; Tyr, tyrosine. *D'après Simonet et al., 2016a*. **(b)** Voies de biosynthèse de la valine, leucine et isoleucine, partagée entre le puceron du pois *A.pisum* et *Buchnera*. En bleu : enzymes codées par *Buchnera* et absentes chez le puceron. En vert : enzymes codées par le puceron et absentes chez *Buchnera*. En rouge : acide aminé mature. *D'après Viñuelas et al., 2011.*

Thèse accessible à l'adresse : https://theses.insa-lyon.fr/publication/2025ISAL0089/these.pdf © [H. Terrasson], [2025], INSA Lyon, tous droits réservés

D'après Brinza *et al.* (2009), on peut citer la perte complète des gènes impliqués dans la synthèse des acides gras, devenues inutiles du fait de l'approvisionnement direct par l'hôte. De même, les principales voies de la glycolyse sont incomplètes. Le cycle de Krebs est absent, tout comme la chaîne respiratoire, rendant *Buchnera* incapable de produire de l'ATP par phosphorylation oxydative. Les mécanismes de défense contre le stress oxydatif, tels que les enzymes de détoxification des espèces réactives de l'oxygène (ROS), ont également disparu. Enfin, la plupart des voies de biosynthèse des cofacteurs et vitamines sont absentes ou très fragmentaires, soulignant la forte dépendance de *Buchnera* vis-à-vis des apports de son hôte.

La réduction de la taille génomique de *Buchnera*, sa compartimentalisation dans le bactériocyte, et son interdépendance vis-à-vis de son hôte, ont comme conséquence notable que la bactérie est devenue incapable de survivre en dehors de son hôte (Bennett & Moran, 2015). Comme mentionné précédemment, de son côté, le puceron, ne peut plus synthétiser ses acides aminés sans son symbiote. Par ailleurs, l'élimination de *Buchnera* par traitement antibiotique affecte sévèrement l'hôte, réduisant sa survie, sa croissance et ses capacités de reproduction (Douglas, 1992, 1996). On parle alors de symbiose obligatoire, car aucun des deux partenaires ne peut survivre correctement sans l'autre.

L'étude du génome de *Buchnera* chez *A. pisum* a servi comme modèle pour étudier les autres bactéries symbiotiques. On sait maintenant que tous les symbiotes obligatoires des insectes possèdent des génomes plus ou moins érodés selon l'ancienneté de l'association (**Figure 4**).

Par exemple, les génomes des différentes souches de *Buchnera* varient de 412 kpb à 645 kpb (Liang *et al.*, 2024). Chez les hémiptères, le cas le plus extrême de réduction symbiotique est celui de *Nasuia deltocephalinicola*, symbiote obligatoire de la cicadelle *Macrosteles quadrilineatus*, dont le génome ne mesure que 112 kpb, et dont l'association avec son hôte remonterait à plus de 200 millions d'années (Bennett & Moran, 2013).

Au sein du même genre bactérien, un cas particulièrement parlant est celui de *Sodalis spp.*, car la taille des génomes des différentes espèces varie en fonction de la nature et de l'ancienneté de la relation avec l'hôte (Renoz *et al.*, 2024). *Sodalis ligni*, une bactérie à vie libre non symbiotique, possède un génome

Thèse accessible à l'adresse : https://theses.insa-lyon.fr/publication/2025ISAL0089/these.pdf © [H. Terrasson], [2025], INSA Lyon, tous droits réservés

généralement supérieur à 6 Mbp (Tláskal *et al.*, 2021) ; *Sodalis glossinidius*, symbiote facultatif et extracellulaire de la mouche tsétsé possède un génome de 4,31 Mpb (Goodhead *et al.*, 2020), tandis que *Sodalis sp.* (PSPU), symbiote intracellulaire obligatoire de la cercope des prés (Aphrophoridae) possède un génome de seulement 1,39 Mbp (Koga & Moran, 2014).

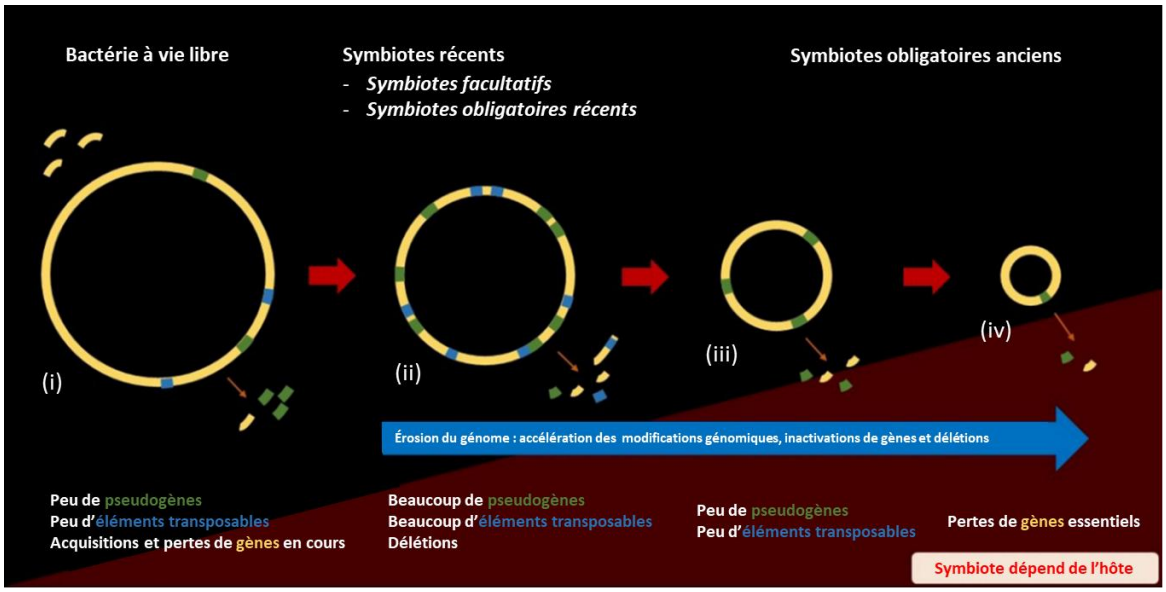


Figure 4 : Aperçu du processus de réduction génomique chez les endosymbiotes. (i) Les bactéries libres possèdent peu de pseudogènes et d'éléments mobiles, et acquièrent régulièrement du matériel génétique provenant de l'environnement ou par échanges avec d'autres bactéries. **(ii)** Lorsqu'une bactérie devient un symbiote intégré à un hôte, son génome accumule des pseudogènes et des éléments mobiles. Avec le temps, les gènes soumis à une pression de sélection relâchée sont perdus, tandis que ceux jouant un rôle essentiel dans l'association sont conservés. **(iii)** Les endosymbiotes ayant développé un haut niveau d'interdépendance avec leur hôte finissent avec un génome extrêmement érodé, purgé des éléments mobiles transposables et des pseudogènes, ne conservant que l'information génétique essentielle à la symbiose. À mesure que l'interdépendance entre l'hôte et le symbiote s'intensifie, l'intégration anatomique du symbiote progresse également : il adopte un mode de vie presque exclusivement intracellulaire, au sein de cellules spécifiques de l'hôte appelées bactériocytes. **(iv)** En limitant les échanges génétiques avec d'autres bactéries de la même espèce, ce mode de vie intracellulaire entraîne une reproduction asexuée, qui contribue elle aussi à la dégénérescence génomique. *D'après Renoz et al. (2023).*

Ce phénomène d'érosion génomique s'explique en partie par une baisse de pression de sélection sur les gènes devenus moins importants et/ou redondants ainsi que par le mode de transmission verticale de ces symbiotes. Seule une proportion faible de symbiotes est transmise à la génération suivante, favorisant l'accumulation de mutations par dérive génétique qui peuvent être considérées comme potentiellement délétères pour la bactérie seule elle-même, mais qui pourront se fixer dans une population si elles n'affectent pas, voire améliorent, la fitness de l'hôte (Moran, 1996 ; Wernegreen 2002 ; Bennett & Moran, 2015). Ces gènes concernés sont progressivement pseudogénéisés par ces mutations successives, puis définitivement éliminés du génome (**Figure 4**) (McCutcheon

Thèse accessible à l'adresse : https://theses.insa-lyon.fr/publication/2025ISAL0089/these.pdf © [H. Terrasson], [2025], INSA Lyon, tous droits réservés

2010 ; McCutcheon & Moran, 2012 ; Moran & Bennett, 2014 ; Goodhead *et al.*, 2020 ; Renoz *et al.*, 2024).

1.1.3 Le cas particulier des symbioses co-obligatoires chez les hémiptères

Bien que *Buchnera* soit présente chez la quasi-totalité des espèces de pucerons (Aphididae), ses capacités métaboliques varient en fonction de l'espèce hôte. Dans certaines sous-familles, comme les Drepanosiphinae (Manzano-Marín *et al.*, 2023), les Lachninae (Manzano-Marín *et al.*, 2017), les Chaitophorinae (Monnin *et al.*, 2020) et les Anoeciinae (Manzano-Marín *et al.*, 2023), le processus d'intégration génomique des *Buchnera* et son hôte est si avancé que le génome du symbiote est fortement érodé, ne conservant plus que des gènes non-redondants dans l'association. Ce processus évolutif s'est accompagné la de perte de larges régions génomiques, incluant des fonctions pourtant utiles à la symbiose. Ces fonctions manquantes sont alors assurées par un autre symbiote, initialement facultatif, devenu co-obligatoire au fil de l'évolution (Manzano-Marín *et al.*, 2017). Selon la sous-famille de pucerons, le symbiote co-obligatoire peut appartenir aux genres *Serratia*, *Sodalis*, ou *Fukatsuia* **(Figure 5**).

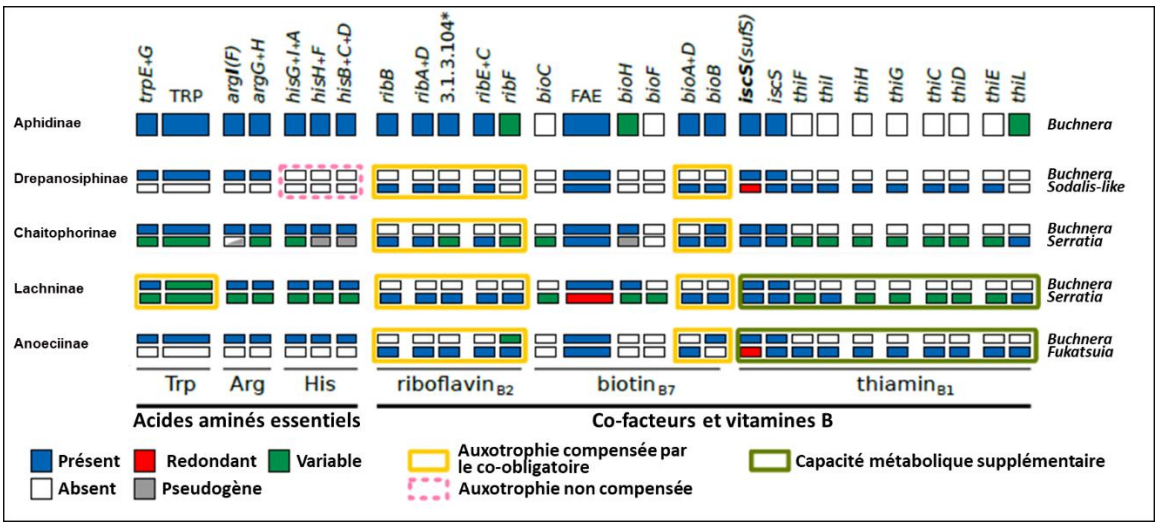


Figure 5 : Complémentation métabolique des symbiotes co-obligatoires chez les Aphididae. A gauche, les sous-familles de puceron hôtes et à droite les genres des symbiotes obligatoires et co-obligatoires qu'elles hébergent. En haut sont indiqués les gènes impliqués dans les voies de biosynthèse du tryptophane (Trp), l'arginine (Arg), l'histidine (His), les vitamines B2 (riboflavine), B7 (biotine) et B1 (thiamine). *Adapté de Manzano-Marín et al. (2023).*

Thèse accessible à l'adresse : https://theses.insa-lyon.fr/publication/2025ISAL0089/these.pdf © [H. Terrasson], [2025], INSA Lyon, tous droits réservés

Chez les Chaitophorinae comme le puceron du mil *Sipha maydis* ou le puceron de l'érable de Norvège *Periphyllus lyropictus* le symbiote co-obligatoire *Serratia symbiotica* (Gammaproteobacteria) assure la biosynthèse de vitamines B, comme la thiamine (B1) et la riboflavine (B2), que *Buchnera* n'est plus capable de produire seule (Monnin *et al.*, 2020 ; Renoz *et al.*, 2022a, 2022b, Baa-Puyoulet 2025) (**Figure 6**).



			A. pisum	*S. maydis*
Biosynthèses	acides aminés	Arg	✓*Ba*	Hôte / *Ba*
		Acide aminés soufrés	✓*Ba*	
		Chorismate	✓*Ba*	✓*Ba* ✓*Ss*
		DAP	✓*Ba*	✓*Ba* ✓*Ss*
		Ile, Leu, Val (précurseurs)	✓*Ba*	✓*Ba* ✓*Ss*
	vitamines	Coenzyme A	/ *Ba*	/ *Ss*
		B1		✓Ss
		B2	✓*Ba*	✓*Ss*
		FRDP (précurseur hème O)	✓Hôte ✓*Ba*	✓Hôte ✓*Ss*
		NAD à partir de NADP	✓Hôte	X
Assimilation	soufre	Sulfate	✓*Ba*	X
		Sulfite	✓Hôte ✓*Ba*	X
	choline	Phosphatidylcholine hydrolyse	✓Hôte	X
		Glycine bétaïne	✓Hôte	X
	carbo-hydrate	Mannose	✓Hôte	X
		Mannitol	✓Hôte	X
		Méllobiose	✓Hôte	X

✓ Réalisable
Codépendance (codépendence entre le régime alimentaire et un organisme)
X Irréalisable, supposé être absent ou inactif dans le métabolisme de l'holobionte
Irréalisable, supposé être compensé par un apport provenant du régime alimentaire du puceron

Figure 6 : Principales différences entre les métabolismes des holobiontes d'*A. pisum* et de *S. maydis*. L'organisme réalisant ou co-réalisant le processus métabolique est désigné comme « hôte » pour *A. pisum* ou *S. maydis*, « *Ba* » pour *B. aphidicola*, ou « *Ss* » pour *S. symbiotica*. DAP : L,L-diaminopimélate ; FRDP : diphosphate de farnésyle ; NAD : Nicotinamide Adénine Dinucléotide ; NADP : nicotinamide adénine dinucléotide phosphate. *D'après Baa-Puyoulet et al., 2025.*

Chez les Lachninae comme *Cinara cedri*, *Buchnera* montre une réduction encore plus extrême de son génome, avec l'un des plus petits génomes connus [(par exemple, les génomes de *B. aphidicola* chez *A. pisum*, *S. maydis* et *C. cedri* font respectivement 640 kpb, 462 kpb et 416 kpb (Lu *et al.*, 2024)]. Chez cette espèce, *Buchnera* n'est plus capable de synthétiser certains acides aminés essentiels, comme le tryptophane, ainsi que plusieurs vitamines (Lu *et al.*, 2024). Cette réduction génomique a conduit à une interdépendance métabolique avec *S. symbiotica*, qui assure ces fonctions perdues (Lamelas *et al.*, 2011). D'autres symbiotes co-obligatoires ont été décrits chez les Lachninae. Le symbiote secondaire *Erwinia spp*. (Gammaproteobacteria) est un symbiote co-obligatoire

Thèse accessible à l'adresse : https://theses.insa-lyon.fr/publication/2025ISAL0089/these.pdf © [H. Terrasson], [2025], INSA Lyon, tous droits réservés

chez certaines espèces du genre *Cinara* (Manzano-Marín *et al.*, 2020). De plus, la présence d'un symbiote du genre *Sodalis.* (Gammaproteobacteria) a été détectée et identifiée comme co-obligatoire chez plusieurs espèces des genres *Eulachnus*, *Cinara*, et *Essigella* ainsi que chez *Nippolachnus piri* (Burke *et al.*, 2009 ; Manzano-Marín *et al.*, 2017, 2023).

Sodalis spp. est également co-obligatoire chez certaines espèces de la famille des Drepanosihpinae comme *Yamatocallis spp.*, *Drepanosiphoniella fugans* ou *Drepanosiphum platanoidis* (Fukatsu, 2001 ; Manzano-Marín *et al.*, 2023).

Enfin, chez les Anoeciinae, on retrouve *Candidatus* Fukatsuia anoeciicola (Gammaproteobacteria) comme symbiote co-obligatoire (Manzano-Marín *et al.*, 2017, 2023).

Ce type de symbiose co-obligatoire n'est pas limité aux pucerons. Comme mentionné au début de l'Introduction de ce manuscrit, ce groupe d'insectes comprend une extraordinaire diversité de systèmes symbiotiques différents, impliquant des symbiotes nutritionnels variés acquis de manière indépendantes au cours de l'évolution. A l'instar de Buchnera *chez les pucerons, la plupart des familles d'hémiptères sont associées avec un symbiote primaire spécifiques, qui ont parfois subi une érosion particulièrement forte de leur génome qui s'est accompagnée de l'acquisition et la fixation d'autres symbiotes nutritionnelles co-obligatoire dans les populations (Figure 1 et 7). Des exemples sont donnés ci-dessous*

Chez les psylles (Psyllidae), qui vivent en association obligatoire avec *Candidatus* Carsonella ruddii (Gammaproteobacteria), certaines espèces hébergent un second symbiote co-obligatoire appartenant aux Enterobacteriaceae, dont l'identité diffère selon les espèces. Ce dernier compense la perte de fonctions métaboliques chez *Carsonella*, notamment pour la synthèse du tryptophane, de l'arginine et des vitamines B (Sloan & Moran, 2012a ; Nakabachi *et al.*, 2020 ; Dittmer *et al.*, 2023 Kwak & Hansen, 2023 ; Kwak *et al.*, 2025).

Thèse accessible à l'adresse : https://theses.insa-lyon.fr/publication/2025ISAL0089/these.pdf © [H. Terrasson], [2025], INSA Lyon, tous droits réservés

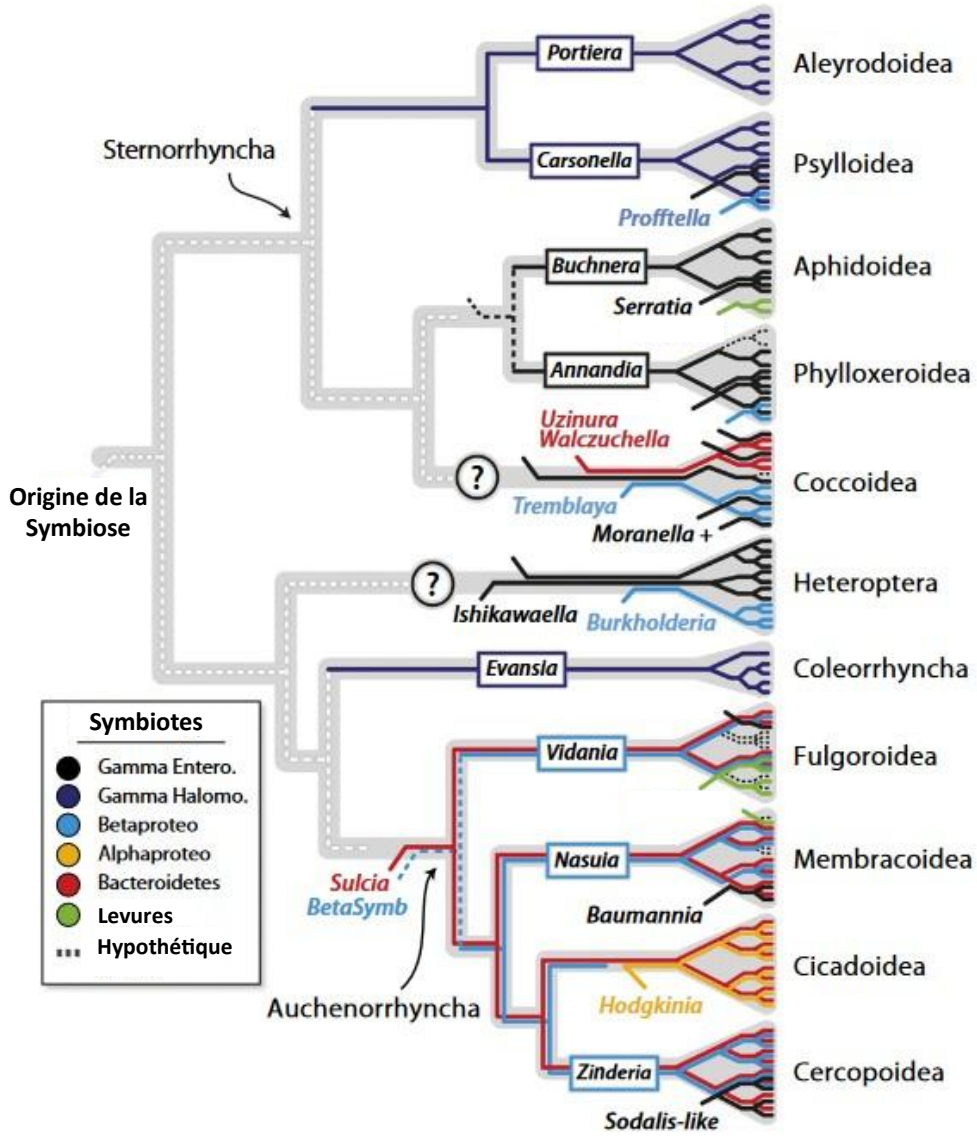


Figure 7 : Résumé des acquisitions et pertes de symbiotes héritables chez les insectes suceurs de sève de l'ordre des Hémiptères. Les phylogénies illustrent les relations évolutives entre les groupes d'insectes hôtes (en gris) et leurs symbiotes. Les lignes colorées indiquent les origines et transmissions de ces symbioses (voir légende). La position de certaines lignées (comme les Coleorrhyncha et Hétéroptères) reste incertaine. Les noms des symbiotes ancestraux sont indiqués dans des encadrés ; certains portent des noms différents selon les clades. Les symbiotes acquis apparaissent à leur point d'entrée sur la phylogénie. Les lignes pointillées représentent des relations ou origines hypothétiques. Une lignée en pointillés blancs symbolise un symbiote ancestral supposé à l'origine de la diversification des Hémiptères, mais dont l'identité reste inconnue. Les lignées terminées par un point d'interrogation signalent des cas encore non résolus. Cette représentation illustre les données connues en 2015. Depuis, certaines données ont été mise à jour (cf texte). *D'après Bennett & Moran (2015).*

Les cochenilles farineuses (Pseudococcidae) quant à elles, vivent en association symbiotique obligatoire avec une bactérie du genre *Tremblaya* (Gammaproteobacteria). Alors que les espèces de la sous-famille Phenacoccinae comme *Phenacoccus avenae* ne vivent qu'avec ce symbiote, la plupart des espèces de la sous-famille des Pseudococcinae, comme *Planococcus citri*, hébergent *Candidatus* Moranella endobia (Gammaproteobacteria) en plus de *Tremblaya spp.* (Husnik *et al.*, 2013 ; Husnik & McCutcheon, 2016). Dans ces

Thèse accessible à l'adresse : https://theses.insa-lyon.fr/publication/2025ISAL0089/these.pdf © [H. Terrasson], [2025], INSA Lyon, tous droits réservés

cas, *Moranella* compense la perte de fonctions métaboliques de *Tremblaya*, en prenant en charge tout ou partie des voies de biosynthèse de tous les acides aminés essentiels et des vitamines B2 et B7, en particulier leurs étapes terminales (López-Madrigal *et al.*, 2014 ; Szabó *et al.*, 2017). À l'inverse, chez les Phenacoccinae, *Tremblaya* possède des voies de biosynthèse complètes, ou complétées par le génome de l'hôte (López-Madrigal *et al.*, 2014).

Chez l'aleurode du tabac (Aleyrodoidea), *Bemisia tabaci*, on retrouve systématiquement le symbiote obligatoire *Candidatus* Portiera aleyrodidarum (Sloan & Moran 2012b ; Sloan & Moran, 2013). Cependant, suivant les études, entre 89% et 98% des individus étudiés comportent un ou plusieurs symbiotes secondaires (Gueguen *et al.*, 2010 ; Mouton *et al.*, 2022). Parmi ces symbiotes on retrouve des bactéries appartenant aux genres *Arsenophonus, Cardinium, Fritschea, Hamiltonella*, *Hemipteriphilus, Rickettsia.* ou encore *Wolbachia.* et dont la composition varie en fonction de l'espèce hôte, de la population échantillonnée et de la localisation géographique (Zchori-Fein *et al.*, 2014 ; Kanakala & Ghanim, 2019 ; Mouton *et al.*, 2022). Des études génomiques, transcriptomiques et métaboliques récentes montrent que ces symbiotes seraient co-obligatoires en participant à la synthèse d'acides aminés et/ou de vitamines en complément et/ou en supplément de *P. aleyrodidarum* (Luan *et al.*, 2015 ; Santos-Garcia *et al.*, 2018 ; Opatovsky *et al.*, 2018 ; Benhamou *et al.*, 2021 ; Selvaraj *et al.*, 2021 ; Fujiwara *et al.*, 2023 ; Li *et al.*, 2024).

Chez les Auchenorrhyncha, les cicadelles (Cicadellidae), cercopes (Cercopidae), cigales (Cicadidae) et fulgores (super-famille des Fulgoroidea), les symbioses co-obligatoires constituent la règle. Chez ces insectes le symbiote obligatoire est *Candidatus* Karelsulcia muelleri (Bacteroidete) (Moran *et al.*, 2005a), il assure la biosynthèse d'une partie des acides aminés essentiels. Le génome de ce symbiote primaire étant fortement réduit, un second symbiote co-obligatoire comme *Candidatus* Baumannia cicadellinicola (Gammaproteobacteria) (Wu *et al.*, 2006 ; McCutcheon & Moran, 2007 ; Bennett & Chong 2017) ou *Candidatus* Nasuia deltocephalinicola (Betaproteobacteria) (Bennett & Moran, 2013; Moriyama *et al.*, 2023) chez les cicadelles, *Candidatus* Zinderia insecticola (Betaproteobacteria) (Koga *et al.*, 2013 ; McCutcheon & Moran, 2010) chez les cercopes, *Candidatus* Hodgkinia cicadicola (Betaproteobacteria) (McCutcheon *et al.*, 2009) chez les cigales ou encore

Thèse accessible à l'adresse : https://theses.insa-lyon.fr/publication/2025ISAL0089/these.pdf © [H. Terrasson], [2025], INSA Lyon, tous droits réservés

Candidatus Vidania fulgoroidea (Gammaproteobacteria) (Gonella *et al.*, 2011 ; Deng *et al.*, 2023) chez les fulgores, complémente les voies métaboliques incomplètes pour la synthèse des nutriments essentiels.

1.1.4 La symbiose nutritionnelle chez les autres insectes

Même si les symbioses nutritionnelles sont particulièrement répandues et étudiées chez les hémiptères, ces derniers ne sont pas les seuls insectes concernés par ce type d'association. Par exemple, chez les coléoptères, les charançons du genre *Sitophilus*, consomment des grains pauvres en vitamines B et en certains acides aminés essentiels. Leur symbiote obligatoire, comme *Sodalis pierantonius* chez le charançon des céréales, remplit ces fonctions en fournissant les nutriments nécessaires à la croissance des larves et à la formation de la cuticule (Vigneron *et al.*, 2014 ; Parisot *et al.*, 2021).

Parmi les Hyménoptères, les fourmis charpentières (*Camponotus floridanus*) se nourrissent principalement de miellat et de sécrétions végétales qui contiennent des quantités insuffisantes d'acides aminés essentiels et de vitamines B. Pour compenser cette carence, elles hébergent *Blochmannia floridanus* (Gammaproteobacteria), qui participe à la synthèse de ces nutriments, contribuant ainsi au développement des colonies (Feldhaar *et al.*, 2007).

Les termites (Blattodea), quant à eux, se nourrissent de bois, une ressource extrêmement pauvre en azote et en nutriments assimilables. Certaines espèces vivent en association avec *Candidatus* Azobacteroides pseudotrichonymphae et/ou *Candidatus* Endomicrobium trichonymphae (Bacteroidetes), capables de fixer l'azote atmosphérique ou de recycler des composés azotés afin de fournir des acides aminés essentiels à leur hôte (Hongoh *et al.*, 2008). D'autres bactéries présentes dans le tube digestif des termites jouent un rôle clé dans la dégradation de la lignocellulose, en fragmentant efficacement la cellulose, l'hémicellulose et la lignine grâce à des enzymes spécialisées (Mikaelyan *et al.*, 2014 ; Brune, 2014 ; Brune & Dietrich, 2015 ; Yuki *et al.* 2015**).** Le termite dit « primitif » *Mastotermes darwiniensis* **(**Blattodea**)** héberge également un symbiote obligatoire du genre *Blattabacterium* (Bacterioidete) (Sabree *et al.*, 2012). Enfin, certaines blattes xylophages (Blattodea), hébergent *Candidatus* Blattabacterium cuenoti, un symbiote qui recycle l'azote et produit des vitamines essentielles (Patiño-Navarrete *et al.*, 2013 ; Kinjo *et al.*, 2022).

Thèse accessible à l'adresse : https://theses.insa-lyon.fr/publication/2025ISAL0089/these.pdf © [H. Terrasson], [2025], INSA Lyon, tous droits réservés

Outre les espèces phytophages citées précédemment, les espèces hématophages strictes dépendent également de symbiotes nutritionnels pour leur reproduction et leur survie. Le sang, bien qu'abondant en protéines, est fortement carencé en vitamines hydrosolubles, notamment en vitamines du groupe B, et en particulier en biotine (vitamine B7), essentielles au métabolisme des métazoaires (Duron & Gottlieb, 2020). On peut citer la mouche tsé-tsé *Glossina morsitans* (Diptera) qui héberge *Wigglesworthia glossinidia* (Gammaproteobacteria) (Akman *et al.*, 2002 ; Bing *et al.*, 2017) ou encore le cas de l'association entre la punaise de lit *Cimex lectularius* et *Wolbachia* (*w*Cle) (Hosokawa *et al.*, 2010).

Ainsi, l'intégration de symbiotes nutritionnels a permis aux insectes de s'affranchir des limitations alimentaires de leur régime et d'exploiter des nouvelles ressources. Ces interactions symbiotiques ont favorisé leur radiation évolutive, en leur permettant d'occuper une vaste gamme de niches écologiques jusqu'alors inaccessibles.

1.2 Autres rôles des symbiotes des insectes

Outre les symbiotes nutritionnels obligatoires, les insectes peuvent héberger une grande diversité de symbiotes qui remplissent des fonctions annexes (Kaltenpoth *et al.*, 2025). Ces symbiotes sont généralement qualifiés de « facultatifs » car (i) leur prévalence chez leur hôte n'est pas de 100% contrairement aux symbiotes obligatoires ; et (ii) leur absence n'empêche pas le développement et la reproduction de leur hôte (Tsuchida *et al.*, 2002 ; Moran *et al.*, 2008 ; Oliver *et al.*, 2014 ; Corbin *et al.*, 2017 ; Zytynska *et al.*, 2021 ; Martins *et al.*, 2023). Les pucerons illustrent particulièrement bien la diversité et la spécificité des rôles que peuvent remplir les symbiotes secondaires (Guo *et al.*, 2017). Chez l'espèce *A. pisum* on a individualisé la possible existence d'au moins huit symbiotes facultatifs dont les rôles commencent tout juste à être décrits.

Thèse accessible à l'adresse : https://theses.insa-lyon.fr/publication/2025ISAL0089/these.pdf © [H. Terrasson], [2025], INSA Lyon, tous droits réservés

1.2.1 Défense contre les guêpes parasitoïdes

Parmi les ennemis naturels des pucerons figurent les guêpes parasitoïdes, qui pondent leurs œufs dans les pucerons. Les larves se développent alors aux dépens de l'hôte, entraînant inévitablement sa mort. (Boivin, 2009). Il a été démontré que chez *A. pisum*, le symbiote facultatif *Candidatus* Hamiltonella defensa (Gammaproteobacteria) confère une protection efficace contre ces parasitoïdes, en particulier contre *Aphidius ervi* (Oliver *et al.*, 2003). Cette protection repose sur la présence d'un bactériophage chez le symbiote, APSE, qui produit des toxines ciblant spécifiquement les parasitoïdes (Oliver *et al.*, 2005). Ainsi, bien que l'œuf pondu par la guêpe éclose normalement, la larve subit une forte mortalité durant son développement en raison de l'action de ces toxines (Oliver *et al.*, 2003, 2005). Le niveau de protection conféré, pouvant atteindre 100 % dans certains cas, varie en fonction de la souche de *H. defensa* et de la présence d'APSE (Oliver *et al.*, 2005, 2008).

S. symbiotica semble également jouer un rôle dans la résistance aux parasitoïdes. Il a été montré que sa présence chez *A. pisum* augmente la mortalité des larves de parasitoïdes entre le quatrième et le cinquième jour après l'oviposition (Oliver *et al.*, 2003, 2005). Cependant, son mécanisme d'action reste moins bien compris et son effet protecteur est plus limité et moins systématique que celui de *H. defensa*.

1.2.2 Resistance aux champignons pathogènes et virus

Certains symbiotes facultatifs du puceron du pois confèrent une protection contre le champignon pathogène *Pandora neoaphidis*. Parmi eux, *Candidatus* Regiella insecticola (Gammaproteobacteria) réduit la mortalité du puceron du pois et limite la sporulation fongique, freinant ainsi la transmission du pathogène (Scarborough *et al.*, 2005 ; Łukasik *et al.*, 2013). D'autres symbiotes comme *Rickettsia sp.* (Alphaproteobacteria) et *Rickettsiella sp.* (Gammaproteobacteria) offrent une protection quasi totale en empêchant le développement et la reproduction du champignon (Łukasik *et al.*, 2013). *Spiroplasma sp.* (Mollicutes), bien que moins efficace, réduit la mortalité et favorise la chute des pucerons infectés, limitant ainsi la propagation du champignon (Łukasik *et al.*, 2013). Les mécanismes exacts restent inconnus,

Thèse accessible à l'adresse : https://theses.insa-lyon.fr/publication/2025ISAL0089/these.pdf © [H. Terrasson], [2025], INSA Lyon, tous droits réservés

mais pourraient impliquer une stimulation immunitaire ou une production d'antifongiques.

Concernant la protection antivirale, *Acyrthosiphon pisum*-virus (APV) est un virus à ARN positif qui infecte les pucerons du pois, réduisant leur survie et leur fécondité (Van den Heuvel *et al.*, 1997). Higashi *et al.* (2023) ont montré que *R. insecticola* confère une protection antivirale en limitant la charge virale d'APV et en atténuant ses effets délétères sur l'hôte, permettant aux pucerons infectés de maintenir une fécondité et une longévité comparables à celles des individus sains.

1.2.3 Tolérance au stress thermique

Certains symbiotes facultatifs influencent la résistance des pucerons au stress thermique. Par exemple, chez *A. pisum*, *S. symbiotica* améliore la survie et la fécondité après un choc thermique, permettant aux pucerons de maintenir leur reproduction sous température élevée (Chen *et al.*, 2000 ; Montllor *et al.*, 2002 ; Russell et Moran, 2006). Cet effet pourrait être lié à la stabilisation des protéines cellulaires sous stress. Chez le même puceron, *H. defensa* confère également une protection modérée, augmentant la survie des pucerons après exposition à la chaleur, bien que son effet sur la fécondité reste limité (Russell et Moran, 2006). A l'inverse, toujours chez *A. piusm*, *R. insecticola* réduit la tolérance thermique**,** entraînant une mortalité accrue sous stress, ce qui ce qui limite son adaptation et sa prévalence dans des environnements chauds (Tsuchida *et al.*, 2002 ; Russell et Moran, 2006).

1.2.4 Influence sur la spécialisation à la plante hôte

Les pucerons, comme *A. pisum*, sont spécialisés sur certaines plantes hôtes, avec des races génétiquement distinctes adaptées à des plantes spécifiques comme la luzerne (*Medicago sativa*) ou le trèfle (*Trifolium pratense*) (Via, 2001 ; Simon *et al.*, 2003). Cette spécialisation est influencée non seulement par les facteurs génétiques de l'hôte, mais aussi par la présence de symbiotes facultatifs (Simon *et al.*, 2003 ; Tsuchida *et al.*, 2004). *R. insecticola* favorise la spécialisation sur le trèfle blanc en augmentant la survie et la fécondité des pucerons sur cette plante (Tsuchida *et al.*, 2004). Inversement, *Rickettsia* réduit la fécondité des pucerons sur *Medicago hispida*, limitant ainsi leur adaptation à

Thèse accessible à l'adresse : https://theses.insa-lyon.fr/publication/2025ISAL0089/these.pdf © [H. Terrasson], [2025], INSA Lyon, tous droits réservés

cette plante (Chen *et al.*, 2000). Enfin, chez *Aphis craccivora*, le symbiote *Arsenophonus spp*. (Gammaproteobacteria) favorise la spécialisation sur le robinier faux-acacia (*Robinia pseudoacacia*), en augmentant la survie et la fécondité des pucerons sur cette plante, tout en réduisant leur succès sur la luzerne (*Medicago sativa*) et la fève (*Vicia faba*) (Wagner *et al.*, 2015).

1.2.5 Résistance face à l'exposition à des substances xénobiotiques

Les symbiotes peuvent également moduler la réponse de l'hôte aux stress xénobiotiques comme les insecticides, les métaux lourds, ou les toxines végétales (Lemoine *et al.*, 2020). Par exemple, l'infection par *S. symbiotica* chez *A. pisum* (Skaljac *et al.*, 2018) et par *Rickettsia sp*., chez l'aleurode *B. tabaci* (Kontsedalov *et al.*, 2008) est associée à une sensibilité accrue aux insecticides chimiques. A l'inverse, l'infection par *H. defensa* chez le puceron *Sitobion miscanthi* est liée à une diminution de la sensibilité aux insecticides grâce à la stimulation de l'activité des enzymes de détoxification, telles que l'acétylcholinestérase, la glutathion-S-transférase et les carboxylestérases. Cette stimulation engendre une meilleure neutralisation de substances insecticides comme l'imidaclopride et l'acétamipride (Li *et al.*, 2021).

Chez d'autres espèces, les symbiotes participent directement à la dégradation des toxines. Par exemple, chez la punaise *Riptortus pedestris* (Alydidae), des bactéries du genre *Caballeronia* (Betaproteobacteria) dégradent le fenitrothion, un insecticide, conférant ainsi une résistance accrue à son hôte (Itoh *et al.*, 2018). De même, chez la mouche des fruits *Bactrocera dorsalis* (Tephritidae, Diptera), une souche de *Citrobacter sp* (Gammaproteobacteria) produit une phosphatase hydrolase qui participe à la dégradation du trichlorfon, un autre insecticide (Itoh *et al.*, 2018).

Les symbiotes sont également impliqués dans la détoxification de toxines végétales, permettant aux insectes herbivores d'exploiter des plantes toxiques (Dearing *et al.*, 2022). Par exemple, chez la mouche de l'olive *Bactrocera oleae* (Tephritidae, Diptera), *Erwinia dacicola* (Gammaproteobacteria), un symbiote intestinal, est capable de dégrader l'oléuropéine, un composé toxique des olives vertes. Ce mécanisme permet à l'hôte d'exploiter cette ressource alimentaire (van den Bosch & Welte, 2017). De même, chez la punaise *Megacopta cribraria* (Plataspidae), le symbiote

Thèse accessible à l'adresse : https://theses.insa-lyon.fr/publication/2025ISAL0089/these.pdf © [H. Terrasson], [2025], INSA Lyon, tous droits réservés

Candidatus Ishikawaella capsulata (Gammaproteobacteria) joue un rôle clé dans la dégradation des isothiocyanates, des composés défensifs des crucifères, améliorant ainsi la tolérance de l'insecte à ces plantes hôtes (van den Bosch & Welte, 2017).

Après avoir décrit les multiples fonctions assurées par les symbiotes chez les insectes, il apparaît essentiel de s'intéresser à leur localisation au sein de l'hôte. En effet, le tropisme cellulaire et tissulaire des symbiotes, qu'ils soient intracellulaires et/ou extracellulaires, ou associés à des structures spécialisées, conditionne étroitement la nature de leur interaction avec l'insecte.

1.3 Tropisme et transmission des symbiotes

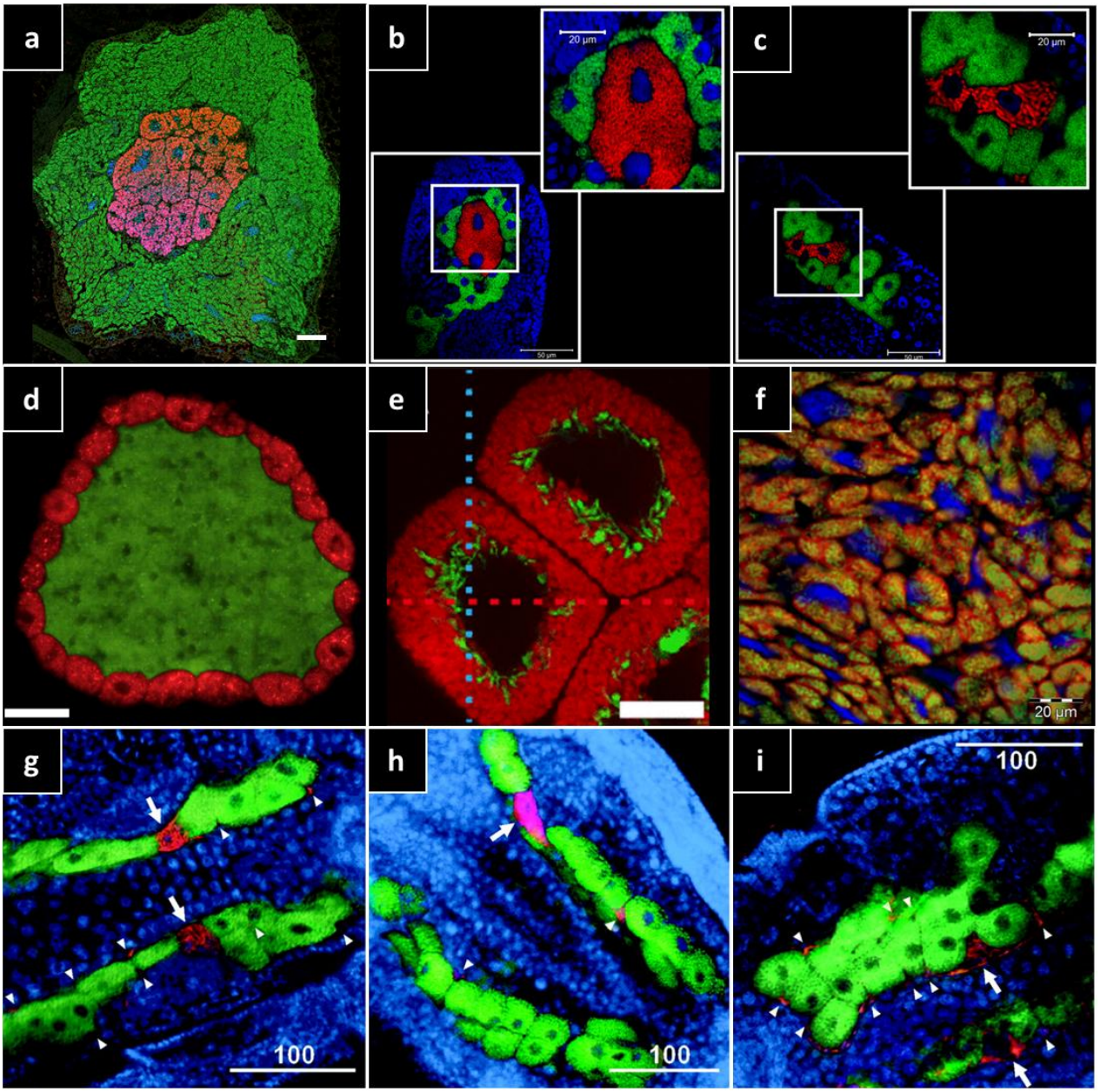
1.3.1 Localisation intracellulaire des symbiotes

Chez les insectes, les symbiotes présentent une grande diversité de tropisme cellulaire : ils peuvent être strictement intracellulaire, exclusivement extracellulaire ou adopter les deux modes à la fois, en fonction de la nature du symbiote et de l'hôte (Gupta & Nair, 2020 ; Kaltenpoth *et al.*, 2025). Le plus souvent, les symbiotes nutritionnels obligatoires sont strictement intracellulaires, et sont qualifiés d'endocytobiotes (Wernegreen, 2012). Dans la lignée germinale, ces symbiotes sont localisés dans les ovaires (cf. paragraphe sur la transmission des symbiotes intracellulaires). Au niveau somatique, ces symbiotes résident au sein de cellules spécialisées appelées bactériocytes (Buchner, 1965 ; Douglas, 1989 ; Baumann, 2005 ; Alarcón *et al.*, 2022) (**Figure 8**). Les bactériocytes, parfois regroupés en un organe nommé bactériome, assurent l'échange de nutriments entre les deux partenaires symbiotiques (Nakabashi *et al.*, 2005 ; Baumann *et al.*, 2005 ; Hansen & Moran, 2011 ; Luan, 2024). Ces structures spécialisées sont présentes dans de nombreux ordres d'insectes (blattoptères, coléoptères, diptères, hémiptères, hyménoptères…) où ils auraient évolué de manière indépendante (Matsuura *et al.*, 2015 ; Alarcón *et al.*, 2022) suggérant qu'il s'agit d'une solution évolutive particulièrement avantageuse pour le

Thèse accessible à l'adresse : https://theses.insa-lyon.fr/publication/2025ISAL0089/these.pdf © [H. Terrasson], [2025], INSA Lyon, tous droits réservés

fonctionnement des interactions symbiotiques (Chomicki *et al.*, 2010 ; Douglas, 2011 ; Alarcón *et al.*, 2022).

Chez les hémiptères, dans le cas spécifique des symbiotes co-obligatoires, les symbiotes primaires et secondaires peuvent être hébergés ou pas dans les mêmes bactériocytes. Chez les pucerons, les psylles, ou les Auchenorrhyncha, les symbiotes obligatoires primaires (*B. aphidicola*, *C. ruddii* ou *K. muelleri*, respectivement) sont hébergés dans des bactériocytes qualifiés de primaires. Les symbiotes co-obligatoires acquis plus récemment par rapport aux symbiotes primaires sont alors localisés dans des bactériocytes secondaires, entourés par les bactériocytes primaires pour les pucerons et les



Thèse accessible à l'adresse : https://theses.insa-lyon.fr/publication/2025ISAL0089/these.pdf © [H. Terrasson], [2025], INSA Lyon, tous droits réservés

Figure 8 : Diversité de tropisme bactériocytaire des endosymbiotes obligatoires, co-obligatoires et facultatifs chez les hémiptères. (a) Localisation des symbiotes chez la cicadelle *Euscelis incisa* par Kobiałka *et al.*, 2018. Le symbiote obligatoire *Karesulcia muelleri* (vert) et co-obligatoire *Nasuia deltocephalinicola* (rouge) dans des bactériocytes distincts. Localisation des symbiotes chez les pucerons *Sipha maydis* et *Anoecia corni* par Manzano-Marín *et al.*, 2023. **(b-c)** Localisation des symbiotes chez les pucerons *Sipha maydis* et *Anoecia corni* par Manzano-Marín *et al.*, 2023. **(b)** Le symbiote obligatoire *Buchnera aphidicola* (vert) et co-obligatoire *Serratia symbiotica* (rouge) dans des bactériocytes distincts chez *S. maidis*. **(c)** Le symbiote obligatoire *Buchnera aphidicola* (vert) et co-obligatoire *Fukatsuia anoeciicola* (rouge) dans des bactériocytes distincts chez *A. corni*. **(d)** Localisation des symbiotes chez le psylle *Diaphorina citri* par Nakabachi *et al.*, 2013. Le symbiote obligatoire *Carsonella rudii* (vert) et co-obligatoire *Profftella armatura* (rouge) dans des bactériocytes distincts. **(e)** Localisation des symbiotes chez l'aleurode *Bemisia tabaci* par Fujiwara *et al.*, 2023. Le symbiote primaire *Portiera aleyrodidarum* (rouge) et secondaire *Hamiltonella defensa* (vert) au sein du même bactériocyte. **(f)** Localisation des symbiotes chez la cochenille farineuse *Planococcus citri* par López-Madrigal *et al.*, 2013. Le symbiote primaire *Tremblaya princeps* (rouge) localisé dans un bactériocyte et le secondaire *Moranella endobia* (vert) localisé à l'intérieur des cellules de *T. princeps*. **(g-i)** Localisation des symbiotes facultatifs chez le puceron *Acyrthosiphon pisum* par Moran *et al.*, 2005b. **(g)** *Buchnera aphidicola* (vert) dans des bactériocytes primaires et *Serratia symbiotica* (rouge) dans des bactériocytes secondaires (flèches blanches) et les « sheath cells » (têtes de flèche blanches). **(h)** *Buchnera aphidicola* (vert) dans des bactériocytes primaires et *Hamiltonella defensa* (rouge) dans des bactériocytes secondaires (flèches blanches) et les « sheath cells » (têtes de flèche blanches). **(i)** *Buchnera aphidicola* (vert) dans des bactériocytes primaires et *Regiella insecticola* (rouge) dans les « sheath cells » (têtes de flèche blanches). Les auteurs suspectaient la présence de *R. insecticola* dans des bactériocytes secondaires (flèches blanche), mais cela a été démenti par la suite, *R. insecticola* est en réalité dans l'hémolymphe sur ces images. (a) Bar = 25 µm ; (b-c) Bar = 50 µm (bas) et 20 µm (haut) ; (d) Bar = 50 µm ; (e) Bar = 100 µm ; (f) Bar = 20 µm ; (g-i) Bar = 100 µm. (a-i) Le bleu correspond au marquage DAPI.

Auchenorrhyncha (**Figure 8a-c**) ou autour des bactériocytes primaires pour les psylles (**Figure 8d**).

Au contraire, chez les aleurodes comme *B. tabaci*, le symbiote primaire *P. aleyrodidarum* et les divers symbiotes co-obligatoires co-localisent dans les mêmes bactériocytes. (Everett *et al.*, 2005 ; Skaljac *et al.*, 2010 ; Raina *et al.*, 2015) (**Figure 8e**). Dans certaines associations, comme celles impliquant *Hamiltionella sp.* ou *Arsenophonus sp,* les deux symbiotes cohabitent au sein de la même cellule, mais restent physiquement séparés par le réticulum endoplasmique du bactériocyte (Fujiwara *et al.*, 2023).

Des cas surprenants de cohabitation ont été rapportés, où le symbiote co-obligatoire plus récemment acquis, est localisé à l'intérieur même du symbiote primaire. Par exemple, chez les cochenilles farineuses, l'endosymbiote obligatoire *Tremblaya spp.* héberge parfois lui-même un symbiote co-obligatoire comme *Candidatus* Moranella endobia (von Dohlen *et al.*, 2001 ; Husnik *et al.*, 2013 ; Husnik & McCutcheon, 2016) (**Figure 8f**). Ce cas extrême est également retrouvé chez certains termites où des protistes intestinaux *Pseudotrichonympha sp.* ou Trichonympha *sp.* hébergent des bactéries symbiotiques obligatoires *Azobacteroides pseudotrichonymphae* (Pramono *et al.*, 2017) et *Endomicrobium trichonymphae* respectivement (Zheng *et al.*, 2015).

Les symbiotes obligatoires ou co-obligatoires peuvent également coloniser d'autres tissus de l'hôte. Par exemple le symbiote *Bukholderia* est

Thèse accessible à l'adresse : https://theses.insa-lyon.fr/publication/2025ISAL0089/these.pdf © [H. Terrasson], [2025], INSA Lyon, tous droits réservés

retrouvé dans le corps gras des cochenilles *Acanthococcus aceris* (Eriococcidae) et *Gossyparia spuria* (Eriococcidae) (Michalik *et al.*, 2016). Chez la punaise *Chilacis typhae* (Artheneidae) (Kuechler *et al.*, 2011) et la cochenille *Marchalina hellenica* (Monophlebidae) (Szklarzewicz *et al.*, 2013), les bactéries symbiotiques sont localisées dans les cellules épithéliales de l'intestin moyen**,** et non dans des structures spécialisées comme les bactériocytes. Chez le puceron *P. lyropictus*, le symbiote co-obligatoire *S. symbiotica* a été acquis tellement récemment qu'il possède une double localisation, étant présent dans les bactériocytes mais également dans le tube digestif (Renoz *et al.*, 2022a).

Enfin, chez certaines familles d'hémiptères, comme les Adelgidae (Toenshoff *et al.*, 2012, 2014) ou les Aphididae (Moran *et al.*, 2005b ; Koga *et al.*, 2012), les endosymbiotes facultatifs peuvent être aussi hébergés dans des bactériocytes. Ces bactériocytes sont aussi qualifiés de secondaires car, comme dans le cas des symbiotes co-obligatoires, (i) ils sont différents des bactériocytes « primaires » qui hébergent le symbiote primaire et (ii) ils hébergerent les symbiotes acquis plus récemment sur le plan évolutif.

Chez le puceron du pois *A. pisum* (Aphididae), qui reste l'une des espèces les plus étudiées vis-à-vis des symbiotes facultatifs, on retrouve les symbiotes facultatifs *S. symbiotica* (Moran *et al.*, 2005b ; Koga *et al.*, 2012) (**Figure 8g**), *Rickettsiella viridis* (Tsuchida *et al.*, 2010, 2014), *H. defensa* (Moran *et al.*, 2005b ; Tsuchida *et al.*, 2014) (**Figure 8h**), *Rickettsia sp.* (Sakurai *et al.*, 2005) ou encore *Candidatus* Fukatsuia symbiotica (Maeda *et al.*, 2024) dans des bactériocytes secondaires. *Rickettsiella sp.* a également été observée intracellulairement dans les oenocytes (Tsuchida *et al.*, 2010, 2014).

Enfin, *R. insecticola* (Tsuchida *et al.*, 2004), peut être retrouvés dans les « sheath cells », des cellules, adjacentes aux bactériocytes, qui ne contiennent jamais le symbiote primaire *B. aphidicola* et dont le rôle est encore inconnu (**Figure 8g-i**). *Rickettsiella sp.* (Tsuchida *et al.*, 2010) *S. symbiotica* (Koga *et al.*, 2003) et *R. insecticola* (Moran *et al.*, 2005b ; Tsuchida *et al.*, 2005) peuvent également être retrouvées extracellulairement, dans l'hémolymphe, chez le puceron du pois.

Thèse accessible à l'adresse : https://theses.insa-lyon.fr/publication/2025ISAL0089/these.pdf © [H. Terrasson], [2025], INSA Lyon, tous droits réservés

1.3.2 Transmission verticale transovarienne des symbiotes

En complément de leur localisation dans des bactériocytes ou des cellules spécifiques du corps gras ou de l'intestin, les symbiotes intracellulaires obligatoires colonisent également les cellules germinales de la mère. Cette localisation permet d'assurer la transmission verticale des symbiotes, de la mère à la progéniture. Cependant, les mécanismes de transmission transovarienne varient en fonctions des espèces et des modes de reproductions.

Pour illustrer cette variation de stratégie, on peut citer l'exemple des pucerons, chez qui le développement embryonnaire et la transmission symbiotique sont bien décrits (Braendle *et al.*, 2003 ; Miura *et al.*, 2003). La plupart des pucerons sont dit holocycliques : ils alternent entre un mode de reproduction sexué ovipare en été, et un mode de reproduction asexué par parthénogénèse vivipare le reste de l'année (Calevro *et al.*, 2019). Chez les femelles sexuées, au cours de la transmission des symbiotes, les bactéries quittent les bactériocytes maternels situés à proximité des ovaires. Elles colonisent ensuite le cytoplasme de l'oocyte à travers l'espace périvitellin (i.e. l'espace situé entre l'épithélium folliculaire et l'oocyte) en passant par le cytoplasme des cellules folliculaires ou par les larges espaces entre les cellules folliculaires voisines (Michalak *et al.*, 2014) (**Figure 9a**). Ce type de colonisation

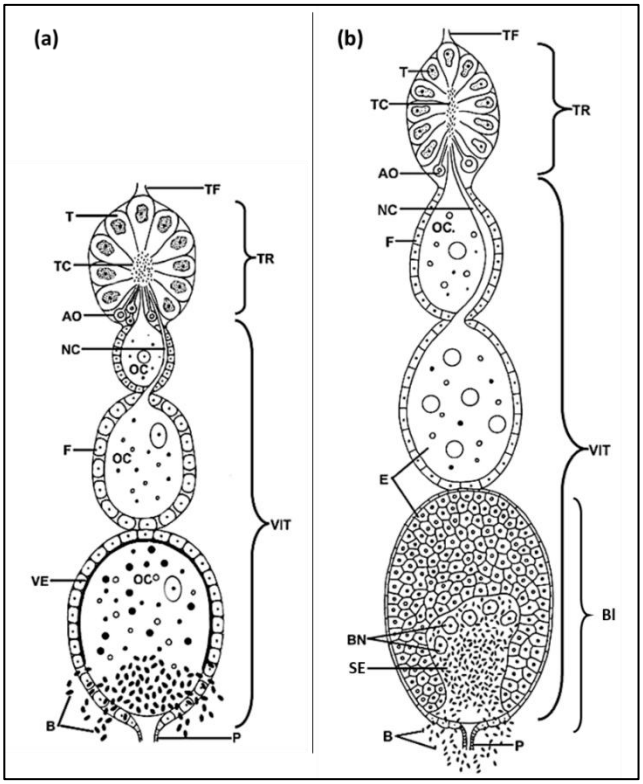


Figure 9 : Représentation schématique de la structure de l'ovaire et de la transmission de *Buchnera* chez des pucerons ovipares et vivipares. (a) Ovaire d'une femelle ovipare. Les bactéries (B) pénètrent dans le cytoplasme de l'oocyte (OC) non-fécondé en traversant l'épithélium folliculaire (FE), là où l'enveloppe de l'œuf (VE) n'est pas encore formée. **(b)** Ovaire d'une femelle parthénogénétique. Les bactéries (B) pénètrent dans le cytoplasme du syncicium embryonnaire (SE) situé à la partie postérieure de la blastula (Bl), avant la formation des bactériocytes. Abréviations : AO – oocyte arrêté, BN – noyaux des bactériocytes, E – embryon, F – épithélium folliculaire, NC – cordon nutritif, OC – oocyte, P – pédicelle, T – trophocyte, TC – centre trophique, TF – filament terminal, TR – tropharium, VIT – vitellarium, VE – enveloppes de l'œuf. *Adapté de Michalik et al. (2014).*

Thèse accessible à l'adresse : https://theses.insa-lyon.fr/publication/2025ISAL0089/these.pdf © [H. Terrasson], [2025], INSA Lyon, tous droits réservés

constitutive des ovaires, avant le début de la reproduction, est aussi observé chez la plupart des hémiptères (Szklarzewicz & Michalik, 2017). Chez les psylles en revanche, les bactéries ne quittent pas le bactériocyte maternel, mais c'est un bactériocyte maternel entier qui rejoint l'ovocyte à travers l'espace périvitellin (Szklarzewicz & Moskal, 2001). On retrouve cette infection constitutive des ovaires chez des espèces plus éloignées comme le charançon des céréales par exemple (Maire *et al.*, 2020).

Chez les pucerons en phase de reproduction parthénogénétique vivipare, la transmission de *Buchnera* est légèrement différente : les symbiotes quittent également les bactériocytes maternels, mais colonisent les embryons déjà en cours de développement, au stade de blastula (Miura *et al.*, 2003 ; Michalik *et al.*, 2014) (**Figure 9b**). Koga *et al.* (2012) ont montré chez *A. pisum* que les symbiotes, primaire (*B. aphidicola*) comme secondaire (*S. symbiotica*), sortaient des bactériocytes maternels vers l'espace extracellulaire par exocytose, puis rejoignaient le cytoplasme syncytial postérieur de la blastula par endocytose (**Figure 10**). Dans les bactériocytes, les *Buchnera* sont individuellement entourées d'une membrane symbiosomale originaire de l'hôte (Charles *et al.*, 2011). Koga *et al.* (2012) suggèrent que cette membrane symbiosomale est issue de cette endocytose par la blastula (**Figure 10**).

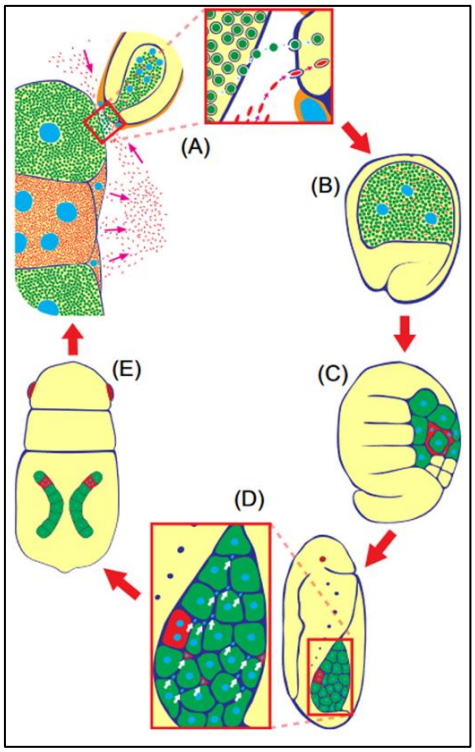


Figure 10 : Dynamiques d'infection de *Buchnera* et *Serratia* au cours du cycle de vie parthénogénétique d'*Acyrthosiphon pisum*. (A) Transmission des symbiontes depuis les bactériocytes maternels vers la blastula : sortie des bactériocytes maternelles par exocytose, passage dans l'espace extracellulaire et colonisation de l'embryon par endocytose. (B) Formation d'un cytoplasme syncytial contenant les symbiontes. (C) Cellularisation des bactériocytes et tri des symbiontes. (D) Apparition des « sheath cells ». (E) Mise en place des bactériomes appariés. En vert, orange et jaune : *Buchnera*, *Serratia*, et embryon hôte, respectivement. *D'après Koga et al. (2012).*

Thèse accessible à l'adresse : https://theses.insa-lyon.fr/publication/2025ISAL0089/these.pdf © [H. Terrasson], [2025], INSA Lyon, tous droits réservés

Chez la mouche tsétsé, bien que sa reproduction soit exclusivement sexuelle, le symbiote primaire n'infecte pas constitutivement les ovaires. En effet, *W. glossinidia* est transmise verticalement *via* les glandes lactifères de la mère qui permettent de nourrir les larves *in utero* (Attaro *et al.*, 2008 ; Balmand *et al.*, 2013).

1.3.3 Localisation extracellulaire

En dehors des bactériocytes, des formes extracellulaires de compartimentalisation sont également observées chez de nombreux insectes. Par exemple, chez certaines punaises, comme *R. pedestris*, les symbiotes du genre *Caballeronia* sont confinés dans des cryptes intestinales spécialisées. Ces structures offrent des conditions chimiques optimales permettant la prolifération des symbiotes tout en excluant les bactéries non symbiotiques (Kikuchi *et al.*, 2007). Ces cavités intestinales spécialisées sont observées chez de nombreux autres hétéroptères phytophages (Hosokawa *et al.*, 2006 ; Salem *et al.*, 2014 ; Hosokawa *et al.*, 2019 ; Shan *et al.*, 2021).

Chez les termites, des compartiments intestinaux distincts assurent également le confinement des symbiotes grâce à des valves intestinales et à des gradients physico-chimiques marqués (Engel & Moran, 2013 ; Brune & Dietrich, 2015).

A l'inverse, certaines associations ne présentent pas de compartimentalisation clairement définie. Chez les abeilles (*Apis mellifera*), par exemple, les communautés symbiotiques intestinales évoluent au sein d'un environnement relativement ouvert, où des gradients chimiques structurent indirectement leurs relations (Callegari *et al.*, 2021). Dans ce cas, l'absence de compartimentalisation stricte peut s'expliquer par les faibles coûts associés au maintien du microbiote : les symbiotes se nourrissent principalement des ressources environnementales disponibles dans l'intestin, et non directement de l'hôte. De plus, la coopération entre les différents membres du microbiote intestinal assure une stabilité fonctionnelle sans nécessiter de séparation physique stricte (Steele *et al.*, 2017 ; Itoh *et al.*, 2019).

Enfin, il existe des cas plus rares où des insectes ont développé des compartiments externes pour héberger leurs symbiotes. Par exemple, chez les fourmis champignonnistes (Attini), les bactéries ectosymbiotiques mutualistes

Thèse accessible à l'adresse : https://theses.insa-lyon.fr/publication/2025ISAL0089/these.pdf © [H. Terrasson], [2025], INSA Lyon, tous droits réservés

du genre *Pseudonocardia* vivent à la surface du corps, dans des structures cuticulaires spécialisées comme des cryptes ou des tubercules. Ces bactéries extracellulaires sont logées dans ces niches cuticulaires et nourries par des glandes exocrines sous-jacentes (Currie *et al.*, 2006 ; Li *et al.*, 2018). Elles jouent un rôle crucial dans la défense du jardin fongique contre des champignons parasites, et sont transmises verticalement *via* les reines ou socialement entre ouvrières (Salem *et al.*, 2015).

1.3.4 Transmission des symbiotes extracellulaires

La transmission des symbiotes exclusivement extracellulaires peut se faire de manières verticale ou horizontale (Salem *et al*., 2015).

Concernant la transmission verticale, on peut citer l'exemple des hétéroptères. Chez ces espèces, la transmission des symbiotes s'effectue avec une phase ectosymbiotique (*i.e.* lorsque le symbiote est en dehors, ou à la surface du corps de l'hôte). Différentes stratégies ont été mises en place pour assurer cette transmission verticale fidèle, telles que l'encapsulation dans les capsules protectrices (Plataspidae), la production de gelées nutritives (Urostylididae), ou l'enduction des œufs (Pyrrhocoridae, Acanthosomatidae), (Fukatsu & Osokawa, 2002 ; Salem *et al.*, 2015).

La transmission horizontale des symbiotes extracellulaires peut également se faire par différentes voies, notamment par coprophagie (comme chez les termites ; Nalepa, 2020), par contact social entre individus (par exemple *via* la trophallaxie chez les abeilles ; Powel *et al*., 2014), ou encore par acquisition environnementale, où les insectes collectent activement les symbiotes dans leur milieu (cas des *Caballeronia* chez *Riptortus pedestris* ; Kikuchi *et al.,* 2007). Ces stratégies, bien que moins fidèles que la transmission verticale, permettent parfois une flexibilité adaptative, notamment dans des environnements changeants où différents symbiotes peuvent conférer des avantages spécifiques.

Après avoir exploré les différentes localisations des symbiotes au sein de leurs hôtes, ainsi que la diversité des structures anatomiques impliquées, il est essentiel de s'intéresser aux dynamiques qui régissent ces associations. Elles évoluent en fonction des besoins de l'hôte, de son environnement et des

Thèse accessible à l'adresse : https://theses.insa-lyon.fr/publication/2025ISAL0089/these.pdf © [H. Terrasson], [2025], INSA Lyon, tous droits réservés

contraintes physiologiques. Dans cette seconde partie, nous examinerons les facteurs qui influencent la densité et la stabilité des populations symbiotiques, en commençant par évaluer le coût que ces associations peuvent représenter pour l'hôte.

Thèse accessible à l'adresse : https://theses.insa-lyon.fr/publication/2025ISAL0089/these.pdf © [H. Terrasson], [2025], INSA Lyon, tous droits réservés

2 Dynamique des symbiotes

2.1 Le coût de la symbiose

Les relations mutualistes représentent un coût énergétique important pour l'hôte qui doit partager une fraction de ses ressources métaboliques avec ses symbiotes. Le maintien de cette relation dépend du bénéfice que l'hôte en retire. Par exemple, les symbioses facultatives chez les pucerons peuvent protéger l'hôte face à différents stress environnementaux. Cependant, la prévalence des symbiotes facultatifs varie selon la période de l'année et la répartition géographique des populations (Brady *et al.*, 2014 ; Zytynska & Weisser, 2016). Cela s'explique par le fait qu'en absence de pression environnementale, ces symbiotes coûteux à entretenir réduisent la fitness de l'hôte (Russell & Moran, 2006 ; Cayetano *et al.*, 2015).

Par exemple, chez le puceron du pois, les symbiotes facultatifs *R. insecticola*, *S. symbiotica*, *H. defensa* ou encore *F. symbiotica* ont tous un impact négatif sur la fitness de leur hôte en conditions de laboratoire (respectivement : Parker *et al.*, 2021 ; Skaljac *et al.*, 2018 ; Vorburger & Gouskov, 2011 ; Maeada *et al.*, 2024).

Le cas de la symbiose obligatoire entre la punaise de lit *C. lectularius* et *Wolbachia* (*w*Cle) illustre également parfaitement cette dynamique. Bien qu'indispensable au bon développement de l'hôte, (Hosokawa *et al.*, 2010) les punaises de lit dont *w*Cle a été éliminée par traitement antibiotique, peuvent continuer à se développer normalement, à condition d'être nourries avec du sang enrichi en vitamines B (Moriyama *et al.*, 2015). À l'inverse, la présence de *w*Cle devient délétère lorsque le sang est supplémenté en vitamines B, se traduisant par une baisse significative de la fécondité et de la survie (Hickin *et al.*, 2022). Cela suggère que, dans ces conditions, le symbiote devient coûteux, voire néfaste.

Un autre exemple est celui de la symbiose entre le charançon des céréales et la bactérie *Sodalis*. L'élimination artificielle du symbiote est possible grâce à un traitement thermique et permet d'obtenir des individus qualifiés d'aposymbiotiques (Heddi *et al.*, 1999). Cela a permis de montrer que les

Thèse accessible à l'adresse : https://theses.insa-lyon.fr/publication/2025ISAL0089/these.pdf © [H. Terrasson], [2025], INSA Lyon, tous droits réservés

nutriments essentiels fournis par le symbiote permettent d'accélérer le développement et d'augmenter la fécondité de l'hôte (Heddi *et al.*, 1999 ; Vigneron *et al.*, 2014). Plus récemment, Dell'Aglio *et al.* (2023) ont montré qu'après un jeûne de deux jours, les larves aposymbiotiques survivent aussi bien que celles nourries quotidiennement, tandis que les larves symbiotiques présentent une réduction de 30 % de leur taux de survie. Les auteurs suggèrent que cette résistance plus faible des larves symbiotiques face au stress nutritif résulte du coût énergétique associé à l'hébergement du symbiote et à sa prolifération exponentielle au cours des stades larvaires.

Ces exemples illustrent que même les symbioses obligatoires peuvent représenter un coût significatif pour l'hôte. Il est indispensable que ce dernier régule ses symbiotes de manière à maintenir un équilibre favorable, dans lequel les bénéfices excèdent les coûts.

Dans la partie suivante, nous verrons comment les densités symbiotiques évoluent en fonction des besoins de l'hôte ou en réponse à des stress environnementaux. Nous aborderons également le cas des symbiotes du microbiote intestinal dont la stabilité, tant en termes de diversité que d'abondance, est indispensable à la survie de l'hôte.

2.2 La densité symbiotique fluctue en fonction des besoins de l'hôte

Plusieurs études ont montré que le coût énergétique associé à la symbiose est positivement corrélé à la densité des symbiotes (Oliver *et al.*, 2006 ; Whittle *et al.*, 2021 ; Parker *et al.*, 2021 ; Drew & King, 2022 ; Whittle *et al.*, 2023). Cette relation existe même dans le cas des symbioses obligatoires, où une densité excessive de symbiotes peut engendrer un coût métabolique supérieur aux bénéfices apportés (Parkinson *et al.*, 2017). Chez les pucerons du pois, par exemple, une corrélation négative a été observée entre la densité de *Buchnera* et la reproduction de l'hôte, soulignant ainsi l'importance de maintenir une densité optimale pour maximiser la fitness (Chong & Moran, 2016). Le maintien de cette densité devient un enjeu central pour l'équilibre coût-bénéfice, illustrant un compromis dynamique entre le soutien métabolique fourni par les symbiotes et

Thèse accessible à l'adresse : https://theses.insa-lyon.fr/publication/2025ISAL0089/these.pdf © [H. Terrasson], [2025], INSA Lyon, tous droits réservés

d'autres fonctions biologiques essentielles comme la croissance ou la reproduction (Whittle *et al.*, 2023).

Pour explorer ces régulations, des approches théoriques et expérimentales ont été mises en œuvre. Des modèles mathématiques ont permis de simuler les mécanismes de régulation de la densité symbiotique par l'hôte, en intégrant des compromis entre coûts et bénéfices associés à différentes densités symbiotiques (Whittle *et al.*, 2023). Ces modèles prédisent l'existence d'une densité optimale de symbiote qui permettrait de maximiser la fitness de l'hôte selon des conditions physiologiques et environnementales (Whittle *et al.*, 2023). Parallèlement, des études expérimentales présentées dans les paragraphes suivants et menées chez le puceron du pois, la punaise de lit, la mouche tsétsé ou encore le charançon ont confirmé que la densité symbiotique fluctue selon les exigences reproductives de l'hôte, sa nutrition ou encore les conditions environnementales, illustrant ainsi un contrôle dynamique et adaptatif de l'hôte sur sa symbiose.

2.2.1 Evolution de la charge symbiotique en fonction du développement

Chez plusieurs insectes, la dynamique des populations symbiotiques reflète les besoins physiologiques spécifiques à chaque étape de leur cycle de vie. Pour illustrer cela, on peut comparer deux espèces, le puceron du pois et le charançon des céréales, chez qui les dynamiques symbiotiques diffèrent et reflètent l'évolution des besoins de leur hôte en fonction du développement.

Chez le puceron du pois, dans les formes se reproduisant par parthénogénèse vivipare, la densité de *B. aphidicola* augmente rapidement au cours des stades nymphaux pour soutenir la croissance et la production d'embryons dans le corps de l'insecte. Une fois le pic reproductif atteint, le nombre de symbiotes décroit, en parallèle de la réduction du nombre de bactériocytes (Simonet *et al.*, 2016b) (**Figure 11a**). Dans cette espèce, on observe néanmoins toujours des bactériocytes et des symbiotes qui semblent fonctionnels (**Figure 11b**), car le puceron est dépendant de sa bactérie symbiotique pendant tout son cycle de vie et peut survivre jusqu'à 20 jours une fois le pic reproductif passé (Simonet *et al.*, 2018) (**Figure 11c**).

Thèse accessible à l'adresse : https://theses.insa-lyon.fr/publication/2025ISAL0089/these.pdf © [H. Terrasson], [2025], INSA Lyon, tous droits réservés

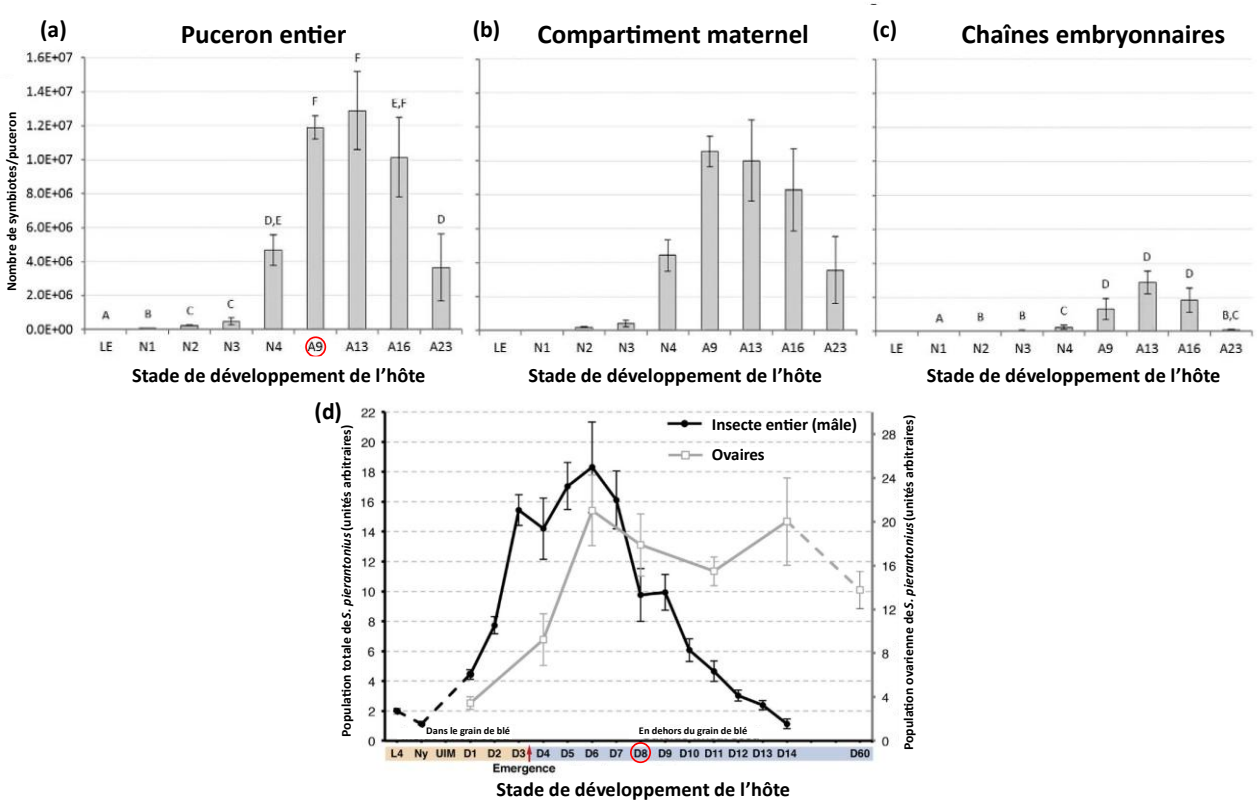


Figure 11 : Evolution de la quantité de symbiote chez le puceron du pois et le charançon des céréales en fonction du développement. (a-c) Dynamique de la population de *B. aphidicola* quantifiée par cytométrie en flux au cours du développement du puceron du pois. **(a)** Variation du nombre de cellules symbiotiques à partir de pucerons entiers ou **(b)** de chaînes embryonnaires en fonction du stade de développement de l'hôte. **(c)** Variation du nombre de cellules de *Buchnera* dans les bactériocytes maternels, calculée par soustraction des chaînes embryonnaires aux moyennes des échantillons de pucerons entiers, en fonction du stade de développement de l'hôte. (a-c) LE = embryons tardifs, N1 à N4 = stade nymphal 1 à 4 et A9 à A23 = adultes âgés de 9 à 23 jours. *D'après Simonet et al., 2016b* **(d)** Dynamique de la population de *Sodalis pierantonius* quantificatifié par qPCR au cours du développement du charançon des céréales. L4 = larve au stade 4 ; Ny = stade pupal ; UIM = dernière mue ; D1 à D60 = adultes âgés de 1 à 60 jours. *D'après Vigneron et al. (2014).* Les résultats sont présentés sous forme de moyennes ± écart-type.

Chez le charançon des céréales, la densité des symbiotes croît exponentiellement après la métamorphose pour fournir les précurseurs nécessaires à la synthèse de la cuticule, avant que la densité ne chute drastiquement une fois cette étape achevée (Vigneron *et al.*, 2014 ; Dell'Aglio *et al.*, 2023) (**Figure 11d**). Contrairement aux pucerons, une fois cette étape passée, on ne retrouve pratiquement plus de symbiote dans les tissus somatiques, les symbiotes se limitant aux tissus reproducteurs afin d'assurer la transmission aux générations suivantes. En effet, contrairement au puceron, l'élimination du symbiote primaire par traitement antibiotique a un impact négatif plus modéré sur sa reproduction (Dell'Aglio *et al.*, 2023). De plus, dans des conditions de laboratoire dans lesquelles la complétion de la formation de la cuticule n'est pas

Thèse accessible à l'adresse : https://theses.insa-lyon.fr/publication/2025ISAL0089/these.pdf © [H. Terrasson], [2025], INSA Lyon, tous droits réservés

critique, il est tout à fait possible de maintenir des lignées de charançon aposymbiotiques (Nardon 1973).

2.2.2 Evolution du nombre de symbiotes en fonction de l'environnement

Les facteurs environnementaux, tels que la disponibilité en nutriments ou encore la température modulent considérablement la dynamique symbiotique modifiant à la fois la densité et la fonctionnalité des symbiotes.

Chez le puceron du pois, la concentration en azote dans l'alimentation impacte directement la densité de *B. aphidicola* : un régime riche en azote favorise sa prolifération, tandis qu'une carence réduit sa densité, limitant ainsi les performances de l'hôte (Wilkinson *et al.*, 2007). De manière intéressante, cette carence en azote entraîne une augmentation relative de la densité du symbiote secondaire *S. symbiotica*, suggérant que les mécanismes de régulation des symbiotes primaires et secondaires diffèrent au sein d'un même hôte (Wilkinson *et al.*, 2007).

Des déficits spécifiques en acides aminés, tels que la leucine ou la phénylalanine, entraînent des réponses adaptatives au niveau des bactériocytes chez le puceron du pois. Ribeiro Lopes *et al.* (2022) ont montré que ces carences augmentent le nombre et la taille des bactériocytes et probablement la charge symbiotique, afin de compenser le déficit. Cette réponse adaptative illustre la plasticité fonctionnelle des bactériocytes dans des conditions de stress nutritionnels modérés. Cependant, en cas de privation prolongée ou extrême (privation totale de nourriture pendant 24h), la capacité de compensation diminue. Ces derniers traitements plus drastiques affectent négativement le nombre de bactériocytes et de symbiotes ainsi que la croissance et la reproduction des pucerons (Ribeiro Lopes *et al.*, 2022). Ces exemples illustrent comment les densités symbiotiques chez les pucerons peuvent varier en réponse aux différents stress nutritifs qu'ils subissent.

Chez la punaise de lit, la disponibilité alimentaire influence également la densité de *w*Cle. Après une densité maximale atteinte au stade de jeune adulte, associée aux besoins reproductifs, la densité du symbiote diminue progressivement uniquement chez les individus soumis à des périodes de jeûne prolongées, illustrant un ajustement dynamique des populations symbiotiques en fonction des ressources disponibles (Poulain *et al.*, 2024).

Thèse accessible à l'adresse : https://theses.insa-lyon.fr/publication/2025ISAL0089/these.pdf © [H. Terrasson], [2025], INSA Lyon, tous droits réservés

La température constitue un autre facteur environnemental clé dans la dynamique des symbiotes. Chez la mouche tsé-tsé (*Glossina spp.*), une exposition à des températures élevées réduit significativement la densité de *W. glossinidia*, limitant ainsi la production de vitamines B essentielle au bon fonctionnement du système immunitaire et à la reproduction. Cet effet est particulièrement marqué chez les femelles gravides, dont les besoins en symbiotes sont accrus pour soutenir la production de larves (Rio *et al.*, 2012). Des effets similaires sont observés chez le charançon du riz (*Sitophilus oryzae*), où des températures élevées ou des régimes alimentaires suboptimaux accélèrent la réduction de *S. pierantonius* après la métamorphose, impactant négativement la capacité de l'hôte à maintenir sa cuticule et à répondre à ses besoins métaboliques (Masson *et al.*, 2015).

Ces exemples soulignent l'importance des facteurs environnementaux dans la dynamique des densités symbiotiques. Par une modulation fine et adaptative des charges la densité des symbiotes selon les ressources ou les contraintes thermiques, les insectes hôtes optimisent leur équilibre métabolique et leur survie. Cette plasticité constitue un élément clé de la stabilité et du succès évolutif des symbioses.

La section suivante s'intéresse à la stabilité d'un autre type de bactéries symbiotiques, celles qui composent le microbiote intestinal des insectes. A l'instar des symbiotes nutritionnels, l'hôte est capable d'exercer un contrôle sur ces bactéries à travers le maintien ou la restauration d'un équilibre microbien fonctionnel malgré les contraintes inhérentes à leur cycle de vie et aux variations de leur environnement.

2.3 Stabilité du microbiote intestinal

Chez l'Homme, le microbiote intestinal est reconnu pour sa remarquable stabilité une fois établi, généralement durant les premières années de vie. Cette stabilité joue un rôle fondamental dans le maintien de fonctions clés telles que la digestion, l'immunité et la protection contre les pathogènes opportunistes, et ce malgré des perturbations ponctuelles comme les infections ou les traitements

Thèse accessible à l'adresse : https://theses.insa-lyon.fr/publication/2025ISAL0089/these.pdf © [H. Terrasson], [2025], INSA Lyon, tous droits réservés

antibiotiques (Zong *et al.*, 2020). En effet, après un stress, le microbiote humain tend à retrouver une composition et une fonctionnalité proches de son état initial (Zong *et al.*, 2020).

Chez les insectes, bien que moins étudiée, la stabilité du microbiote intestinal joue également un rôle crucial dans leur fitness. Leurs cycles de vie, caractérisés par des mues successives ou des métamorphoses complètes, entraînent des remaniements profonds de l'intestin, susceptibles de perturber les communautés microbiennes associées (Engel & Moran, 2013 ; Hammer & Moran, 2019 ; Schmidt & Engel, 2021). Malgré ces contraintes, plusieurs études montrent que le microbiote des insectes est capable de se reconstituer après une perturbation, retrouvant ainsi un équilibre fonctionnel essentiel à la survie de l'hôte (Tinker & Ottesen, 2016 ; Bodawatta *et al.*, 2021 ; Bai *et al.*, 2021 ; Mason & Shikano, 2023).

Chez les drosophiles (*D. melanogaster*), élevées en laboratoire, le microbiote intestinal est composé d'un nombre restreint d'espèces dominantes (allant de deux à cinq), principalement des bactéries du genre *Lactobacillaceae* et *Acetobacteraceae* (Pais *et al.*, 2018). Malgré sa simplicité, ce microbiote exerce des fonctions essentielles dans le développement, la nutrition et la réponse immunitaire de l'hôte (Marra *et al.*, 2021). Une altération prolongée de cette communauté microbienne peut entraîner des retards de croissance ou une vulnérabilité accrue aux infections, compromettant ainsi la fitness de l'insecte (Guo *et al.*, 2014 ; Ma *et al.*, 2015 ; Zheng *et al.*, 2017). Cependant, il a été démontré que, à la suite de stress environnementaux tels qu'un changement brutal de régime alimentaire, le microbiote de la drosophile peut revenir à une composition proche de son état initial, illustrant une capacité de résilience adaptative (Pais *et al.*, 2018 ; Arias-Rojas *et al.*, 2023 ; Wesseltoft *et al.*, 2024).

Chez l'abeille domestique (Apis mellifera), la stabilité du microbiote est essentielle non seulement pour la santé individuelle des ouvrières mais aussi pour la survie et la productivité des colonies. Ce microbiote se compose de bactéries spécifiques, telles que *Snodgrassella alvi* et *Gilliamella apicola*, qui colonisent des niches précises de l'intestin et assurent des fonctions critiques comme la digestion des polysaccharides complexes et la protection contre les pathogènes (Motta & Moran, 2024). Ces bactéries sont transmises au sein des colonies par trophallaxie, garantissant ainsi une continuité entre générations (Powell *et al.*,

Thèse accessible à l'adresse : https://theses.insa-lyon.fr/publication/2025ISAL0089/these.pdf © [H. Terrasson], [2025], INSA Lyon, tous droits réservés

2016). Bien que des facteurs de stress tels que l'exposition aux pesticides ou l'administration d'antibiotiques puissent perturber temporairement cette communauté (Raymann *et al.*, 2017), le microbiote peut en partie se rétablir dans des conditions favorables (dose faible et exposition non prolongée) (Motta *et al.*, 2020).

Chez les termites et les cafards, la stabilité du microbiote intestinal est directement liée à leur capacité à exploiter des ressources alimentaires spécifiques. Les termites, par exemple, dépendent de leur microbiote pour digérer la cellulose, leur principale source d'énergie. Les bactéries impliquées dans ce processus sont transmises par des comportements sociaux comme la coprophagie (Brune & Dietrich, 2015 ; Tinker & Ottesen, 2016). Après une perturbation, le microbiote peut être restauré par ces échanges interindividuels, permettant aux termites de récupérer leur capacité digestive (Engel & Moran, 2013 ; Schmidt & Engel, 2021). Cependant, si ces perturbations se prolongent ou si les mécanismes de transmission sont altérés, la restauration du microbiote peut être compromise, affectant gravement la survie et la reproduction de l'hôte (Inagaki & Matsuura 2018).

Ainsi, la stabilité du microbiote apparaît comme un élément central de la survie et de la reproduction chez de nombreux insectes. Qu'il s'agisse du développement, de la digestion ou de l'adaptation aux variations environnementales, cette stabilité garantit le maintien des fonctions vitales. Elle met également en évidence le rôle essentiel du contrôle exercé par l'hôte dans la préservation d'une communauté microbienne adaptée à ses besoins physiologiques.

Comprendre les mécanismes de régulation mis en place par les hôtes pour maîtriser la densité, la localisation ou encore l'activité de leurs symbiotes permet de mieux appréhender la stabilité et la plasticité de ces associations. Dans cette perspective, le prochain chapitre abordera les stratégies évolutives ayant permis aux insectes de contrôler activement leurs partenaires symbiotiques afin de maintenir des relations bénéfiques et durables.

Thèse accessible à l'adresse : https://theses.insa-lyon.fr/publication/2025ISAL0089/these.pdf © [H. Terrasson], [2025], INSA Lyon, tous droits réservés

3 Comment les symbiotes sont-ils régulés ?

L'évolution de la densité des symbiotes en fonction des besoins physiologiques et environnementaux de l'hôte met en évidence un contrôle dynamique de ces populations. Si ces ajustements reflètent des contraintes écologiques et métaboliques, ils impliquent aussi des mécanismes de régulation, permettant d'optimiser la balance entre les bénéfices et les coûts de la symbiose.

Un des moyens les plus efficaces pour limiter les symbiotes consiste à restreindre l'allocation des ressources, un mécanisme largement observé chez les plantes et certains unicellulaires. Les plantes symbiotiques allouent préférentiellement leurs ressources aux symbiotes les plus performants, notamment dans les mutualismes rhizobiens (bactéries symbiotiques) et mycorhiziens (champignons symbiotiques) (West *et al.*, 2002 ; Bever, 2015). Les nodules contenant des souches rhizobiennes performantes reçoivent plus de nutriments, tandis que les symbiotes peu efficaces sont sanctionnés par un apport réduit, limitant leur prolifération (Simms *et al.*, 2006 ; Sachs *et al.*, 2010).

Cette approche « passive » est rendue possible par la capacité de ces organismes à se débarrasser de structures symbiotiques devenues inutiles, comme des nodules ou des cellules symbiotiques, sans compromettre durablement leur survie (Bever *et al.*, 2009).

Les insectes combinent souvent plusieurs modalités pour contrôler leurs symbiotes. La compartimentalisation dans des structures spécialisées comme les bactériocytes en représente une (Chomicki *et al.*, 2020), mais ce n'est pas la seule.

La coexistence entre un insecte hôte et ses symbiotes intracellulaires repose sur un équilibre délicat : l'hôte doit tolérer ses partenaires microbiens tout en conservant la capacité de répondre efficacement à des pathogènes. Les peptides antimicrobiens (AMPs), produits majeurs de l'immunité innée, jouent à ce titre un rôle potentiellement ambivalent, car leur expression doit être finement régulée pour ne pas nuire aux symbiotes bénéfiques. Comprendre les mécanismes de production et de contrôle des AMPs est donc crucial pour saisir comment les

Thèse accessible à l'adresse : https://theses.insa-lyon.fr/publication/2025ISAL0089/these.pdf © [H. Terrasson], [2025], INSA Lyon, tous droits réservés

insectes parviennent à ménager leurs symbiotes tout en maintenant une protection immunitaire efficace.

3.1 Les peptides antimicrobiens chez les insectes : voies immunitaires et rôles universels

Chez les insectes, la première ligne de défense contre les infections repose sur des barrières physiques et chimiques, principalement la cuticule et l'épithélium intestinal. Lorsque ces barrières sont franchies, l'immunité innée constitue la principale réponse de l'organisme pour lutter contre les microbes pathogènes (Siva-Jothy *et al.*, 2005). Cette réponse immunitaire repose sur deux types de mécanismes complémentaires.

D'une part, elle met en jeu la défense cellulaire, qui est assurée chez les insectes par les hémocytes. Ces cellules circulantes de l'hémolymphe jouent un rôle clé dans l'élimination des pathogènes par phagocytose, encapsulation et mélanisation (Lemaitre & Hoffmann, 2007). Chez certains insectes comme *D. melanogaster*, les différents hémocytes exercent des fonctions distinctes : les plasmatocytes sont impliqués dans la phagocytose, les lamellocytes sont spécialisés dans l'encapsulation des particules de grande taille et les cellules cristallines participent à la réaction de mélanisation *via* l'activation de la cascade de la prophenoloxydase (proPO) (Lemaitre & Hoffmann, 2007). D'autre part, la réponse immunitaire chez les insectes repose sur la défense humorale qui mobilise la production de molécules antimicrobiennes en réponse à une infection (**Figure 12**). Après la reconnaissance des motifs moléculaires associés aux pathogènes (PAMPs, pour « Pathogen-Associated Molecular Patterns ») par des récepteurs de reconnaissance de motifs moléculaires (PRRs, pour « Pattern Recognition Receptors »), des voies de signalisation intracellulaires s'activent et induisent la production de peptides antimicrobiens (AMPs, pour Antimicrobial Peptides), qui ciblent et éliminent les micro-organismes envahisseurs (Lemaitre & Hoffmann, 2007 ; Zhang *et al.*, 2021). Ces AMP sont principalement produits et sécrétés par le corps gras, sous le contrôle des voies de signalisation IMD (Immune-deficiency Pathway) et Toll. D'autres voies, plus secondaires, comme

Thèse accessible à l'adresse : https://theses.insa-lyon.fr/publication/2025ISAL0089/these.pdf © [H. Terrasson], [2025], INSA Lyon, tous droits réservés

JAK/STAT (Janus Kinase / Signal Transducer and Activator of Transcription pathway) et JNK (c-Jun N-terminal Kinase pathway), participent également à cette régulation (Kallio *et al.*, 2005 ; Lemaitre & Hoffmann, 2007 ; Zhang *et al.*, 2021 ; Zhou *et al.*, 2024).

3.1.1 La voie IMD

La voie IMD (**Figure 12a**) est principalement activée par des bactéries à Gram négatif, mais elle peut également être déclenchée par certaines bactéries à Gram positif possédant des peptidoglycanes à haut contenu d'acide diaminopimélique (DAP), comme *Listeria monocytogenes* (Martin *et al.*, 2018). Son activation repose sur la reconnaissance de fragments de peptidoglycanes libérés par les bactéries. Ces fragments sont détectés par des récepteurs de reconnaissance de motifs moléculaires (PRRs) spécifiques de l'hôte, appelés Peptidoglycan Recognition Proteins (PGRPs). Les PGRP de type transmembranaire (ex. : PGRP-LC chez la drosophile) détectent directement ces motifs bactériens et initient la cascade de signalisation immunitaire. D'autres PGRP, solubles cette fois (ex. : PGRP-LE), interviennent dans la détection des pathogènes extracellulaires. Enfin certaines classes de PGRP (notamment PGRP-

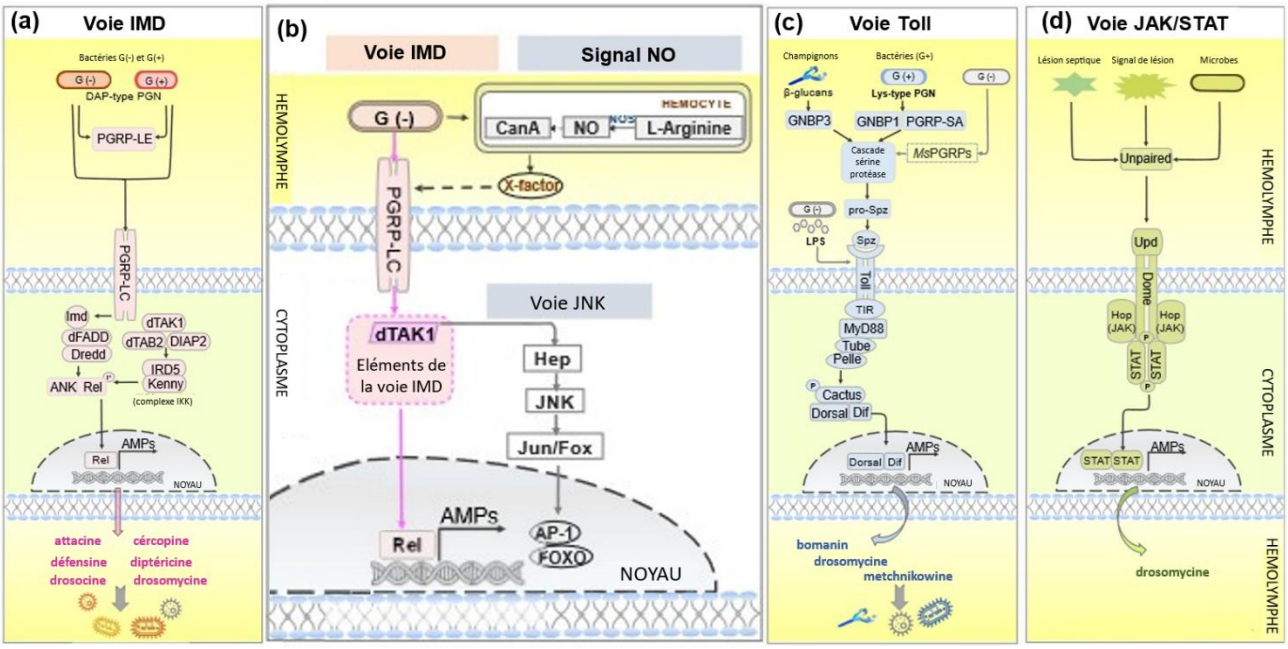


Figure 12 : Récapitulatif des voies immunitaires humorales responsables de l'expression des peptides antimicrobiens chez les insectes. (a) Cascade de signalisation des voies IMD et **(b)** JNK interconnectées. **(c)** Casacade de signalisation de la voie Toll et **(d)** de la voie JAK/STAT. *Adapté de Zhou et al. (2024).*

Thèse accessible à l'adresse : https://theses.insa-lyon.fr/publication/2025ISAL0089/these.pdf © [H. Terrasson], [2025], INSA Lyon, tous droits réservés

LB, PGRP-SB et PGRP-SC) agissent comme des inhibiteurs de la voie IMD : ils dégradent directement les PAMPs, limitant ainsi l'activation des cascades IMD ou Toll (Zaidman-Rémy *et al.*, 2006 ; Yao *et al.*, 2022).

Une fois les fragments détectés, une cascade de signalisation intracellulaire s'enclenche. La protéine IMD, qui sert de plateforme pour l'assemblage du complexe de signalisation, est recrutée par les PGRP transmembranaires (Lemaitre & Hoffmann, 2007). Cela conduit à l'activation successive de plusieurs protéines, dont FADD (Fas associated death domain) et la caspase Dredd, qui clivent le facteur de transcription Relish en deux fragments. La partie N-terminale de Relish migre alors vers le noyau où elle induit l'expression des AMP. Parallèlement, la signalisation passe par les protéines Tak1 et Tab2, qui activent un autre complexe enzymatique, aboutissant à la phosphorylation et à la translocation nucléaire de Relish. (Lemaitre & Hoffmann, 2007). La protéine Tak1 active en outre la voie JNK (**Figure 12b**), qui semble jouer un rôle crucial dans la régulation spécifique de l'expression des AMP (Kallio *et al.*, 2005 ; Delaney *et al.*, 2006). Tak1 phosphoryle la kinase Hep, qui à son tour active basket (JNK). Cette kinase phosphoryle ensuite le facteur de transcription Jra1, qui forme un complexe la protéine Kayak. Ensemble, ils constituent le facteur de transcription AP-1, impliqué notamment dans l'induction d'AMP (**Figure 12b**). Bien que généralement décrite comme dépendante de la voie IMD et activée par Tak1, la voie JNK pourrait être aussi activée de manière indépendante *via* le facteur de nécrose tumorale Eiger, identifié chez la drosophile (Igaki *et al.*, 2002 ; Bidla *et al.*, 2007).

L'activation de cette cascade aboutit à la synthèse et à la sécrétion d'AMP capables de cibler et d'éliminer les bactéries pathogènes, renforçant ainsi la protection de l'organisme contre les infections bactériennes (Lemaitre & Hoffmann, 2007, Zhou *et al.*, 2024).

3.1.2 La voie Toll

Contrairement à la voie IMD, principalement impliquée dans la défense contre les bactéries à Gram négatif, la voie Toll (**Figure 12c**) joue un rôle essentiel dans la réponse immunitaire contre les bactéries à Gram positif et les champignons pathogènes. Elle intervient également, dans une moindre mesure,

Thèse accessible à l'adresse : https://theses.insa-lyon.fr/publication/2025ISAL0089/these.pdf © [H. Terrasson], [2025], INSA Lyon, tous droits réservés

dans certaines réponses antivirales et antiparasitaires (Lemaitre & Hoffmann, 2007).

L'activation de cette voie repose sur la reconnaissance des motifs moléculaires associés aux pathogènes (PAMP) par des récepteurs solubles spécifiques présents dans l'hémolymphe. Parmi eux, les PGRP sont spécialisés dans la détection des peptidoglycanes de type lysine, caractéristiques des bactéries à Gram positif (Lemaitre & Hoffmann, 2007). D'autres récepteurs solubles, comme les GNBP (Gram-Negative Binding Proteins), participent également à l'activation de la voie Toll. D'autres membres de cette famille, à l'instar de GNBP3, sont spécialisés dans la détection des β-glucanes présents dans la paroi des champignons, notamment celle des levures. L'activation de la voie Toll peut aussi être déclenchée par la détection de protéases pathogènes *via* la protéine Persephone, permettant une réponse immunitaire, même en l'absence de reconnaissance directe des PAMPs (Lemaitre & Hoffmann, 2007, Zhou *et al.*, 2024).

Une fois ces signaux détectés, une cascade de sérine-protéases extracellulaires est activée, entraînant le clivage de la protéine Spätzle. Sous sa forme clivée Spätzle devient apte à se lier au récepteur transmembranaire Toll, déclenchant une cascade de signalisation intracellulaire. Celle-ci mobilise un complexe protéique qui aboutit à l'activation de facteurs de transcription de la famille NF-κB, notamment Dorsal et Dif. Ces facteurs migrent ensuite vers le noyau, où ils induisent l'expression de gènes codant les AMPs, qui sont sécrétés dans l'hémolymphe afin d'éliminer les pathogènes (Lemaitre & Hoffmann, 2007, Zhou *et al.*, 2024).

3.1.3 La voie JAK/STAT

Initialement décrite pour son rôle dans la défense antivirale (Lemaitre & Hoffmann, 2007), la voie de signalisation dite JAK/STAT (**Figure 12d**) est désormais reconnue comme étant activée en réponse à divers types de dommages cellulaires, causés notamment par certaines infections virales ou bactériennes (Bang, 2019 ; Ding *et al.*, 2024 ; Zhou *et al.*, 2024). Par ailleurs, plusieurs travaux ont montré que cette voie est impliquée dans la régulation de l'expression de peptides antimicrobiens, comme la drosomycine chez la drosophile (Buchon *et al.*, 2009).

Thèse accessible à l'adresse : https://theses.insa-lyon.fr/publication/2025ISAL0089/these.pdf © [H. Terrasson], [2025], INSA Lyon, tous droits réservés

En réponse aux dommages cellulaires, les cellules affectées sécrètent des cytokines de la famille Unpaired (Upd1, Upd2, Upd3), qui se lient au récepteur transmembranaire Dome, provoquant sa multimerisation. Cette activation recrute Hop, l'homologue de de la kinase JAK, qui phosphoryle Dome par trans-phosphorylation. Hop active ensuite Stat92E en phosphorylant ses résidus tyrosine conservés, permettant sa dimérisation et sa translocation vers le noyau. Stat92E régule alors l'expression de nombreux gènes cibles, dont ceux codant pour des AMP (Myllymäki *et al.*, 2014 ; Bang, 2019).

3.1.4 Le système immunitaire des insectes comme régulateur de l'homéostasie de leur microbiote

Le système immunitaire des insectes joue un rôle crucial dans l'homéostasie de leur microbiote intestinal (Bai *et al.*, 2021 ; Kwong *et al.*, 2017 ; Guo *et al.*, 2023 ; Buchon *et al.*, 2013a,b). Chez *D. melanogaster*, le microbiote intestinal est responsable de l'induction d'une forte expression des gènes immunitaires, notamment ceux de la voie IMD (Broderick *et al.*, 2014). Chez les mouches mutantes déficientes pour cette voie (Rel^{E20}), on observe un déséquilibre dans la composition et l'abondance relative du microbiote, accompagnée d'une augmentation de la charge bactérienne globale, ce qui se traduit par une réduction de la longévité de l'insecte (Broderick *et al.*, 2014 ; Marra *et al.*, 2021). Marra *et al.* (2021) ont montré que ce déséquilibre est principalement dû à l'absence d'AMP. En effet, des mutants dépourvus d'AMP, présentent des altérations similaires, notamment une surabondance de bactéries du genre *Acetobacter* et une augmentation de la charge bactérienne globale.

De manière similaire, Kwong *et al.* (2017) ont montré que les abeilles *A. mellifera* colonisées par leur flore intestinale normale présentent une hausse de l'expression et de la présence des AMP, notamment l'apidaecin et l'hymenoptaecin, dans leur tube digestif. Comme chez *D. melanogaster*, ces peptides semblent essentiels à l'équilibre du microbiote et à la défense contre les infections à travers la stimulation du système immunitaire.

Bien que les AMP limitent la prolifération du microbiote, leur expression constitutive suggère qu'ils ne suffisent pas à l'éliminer totalement. En effet, les bactéries symbiotiques de la drosophile et de l'abeille montrent une résistance accrue à ces peptides par rapport à des pathogènes cultivés *in vitro*

Thèse accessible à l'adresse : https://theses.insa-lyon.fr/publication/2025ISAL0089/these.pdf © [H. Terrasson], [2025], INSA Lyon, tous droits réservés

(Kwong *et al.*, 2017 ; Arias-Rojas *et al.*, 2023). Ces symbiotes ont développé des mécanismes d'échappement leur permettant de résister à cette pression immunitaire et de persister dans le tube digestif de l'hôte. Chez la drosophile, *Lactiplantibacillus plantarum*, un mutualiste intestinal, illustre bien cette adaptation. Les souches mutantes sensibles aux AMP sont éliminées après infection, tandis que les souches résistantes maintiennent leur colonisation. Cette résistance repose sur des modifications de la paroi bactérienne, comme l'O-acétylation du peptidoglycane et l'alanylation des acides teichoïques, qui réduisent l'affinité des AMP pour la paroi et limitent ainsi leur activité bactéricide (Arias-Rojas *et al.*, 2023).

En plus de leur résistance accrue aux AMP, certains membres du microbiote modulent activement la réponse immunitaire de l'hôte en stimulant l'expression d'inhibiteurs de la voie IMD, comme les PGRP-LB ou PGRP-SB (Charroux *et al.*, 2018 ; Yao *et al.*, 2022). Chez la mouche *Bactrocera dorsali,* une inactivation fonctionnelle de PGRP-LB induit une surexpression des AMP et une réduction de la densité des mutualistes dans le tube digestif (Yao *et al.*, 2022).

Chez la plupart des insectes modèles, tels que Drosophila melanogaster, les voies immunitaires Toll, IMD, JAK/STAT et JNK participent de manière coordonnée à la reconnaissance et à l'élimination des agents pathogènes, et au contrôle de leur microbiote, notamment à travers l'induction de peptides antimicrobiens. Toutefois, cette architecture immunitaire ne semble pas universelle au sein des insectes.

3.1.5 Immunité chez les des pucerons et autres hémiptères

Depuis le séquençage du génome du puceron du pois, les chercheurs se sont mobilisés pour comprendre le fonctionnement de l'immunité dans ce groupe d'insectes.

La réponse immunitaire cellulaire des pucerons semble bien fonctionnelle (Laughton *et al.*, 2011). Différentes cellules immunitaires ont été décrites dans l'hemolymphe du puceron du pois : des prohémocytes, (précurseurs des différents hémocytes) ; des plasmatocytes, impliqués dans la phagocytose et

Thèse accessible à l'adresse : https://theses.insa-lyon.fr/publication/2025ISAL0089/these.pdf © [H. Terrasson], [2025], INSA Lyon, tous droits réservés

l'encapsulation ; des sphérulocytes, jouant un rôle dans la coagulation ; des granulocytes capables de phagocyter, de produire des espèces réactives de l'oxygène (ROS) et de déclencher la cascade de la phénoloxydase (PO) (Schmitz *et al.*, 2012). L'activation de cette dernière peut mener à une réponse de mélanisation.

Concernant la voie humorale, l'analyse du génome du puceron du pois a montré un potentiel immunitaire très réduit avec l'absence de plusieurs gènes clés impliqués dans la voie IMD (Gerardo *et al.*, 2010, IAGC 2010). Aucun homologue des gènes codant les PGRP, dFADD, Dredd, Kenny, ird5, Ankyrin, Relish ou les AMP n'a pu être identifié non plus, soulevant des interrogations sur la capacité des pucerons à reconnaître et à éliminer les bactéries à Gram négatif (**Figure 13**). Laughton *et al.* (2011) ont ensuite évalué la capacité antibactérienne de l'hémolymphe de *A. pisum* en l'utilisant pour réaliser un antibiogramme vis-à-vis de deux espèces bactérienne *E. coli* et *Micrococcus luteus*. L'hémolymphe était issue de pucerons soumis à différentes conditions (contrôle, blessure, infection simulée). Aucune activité antimicrobienne n'a été détectée, ce qui a été interprété par les auteurs comme une confirmation de l'absence d'AMP fonctionnels chez *A. pisum*.

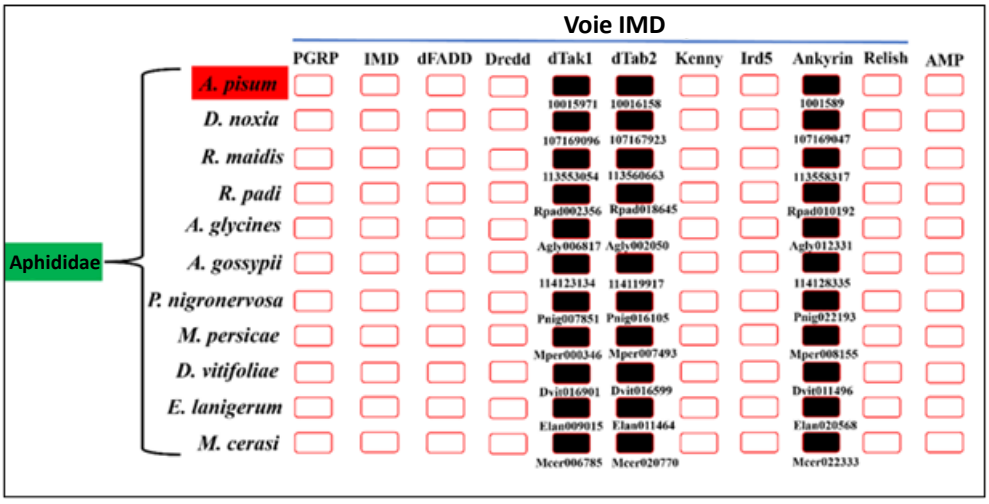


Figure 13 : Voie immunitaire IMD dégradée chez onze espèces de puceron. Les gènes principaux impliqués dans la voie IMD sont représentés par un rectangle rouge vide ou plein s'ils sont absents ou présent dans le génome de l'espèce concernée, respectivement. *D'après Ma et al. (2022).*

De plus, bien que la voie Toll soit conservée chez le puceron du pois l'absence des récepteurs (PGRP) en amont et d'effecteurs antimicrobiens (AMP)

Thèse accessible à l'adresse : https://theses.insa-lyon.fr/publication/2025ISAL0089/these.pdf © [H. Terrasson], [2025], INSA Lyon, tous droits réservés

en aval soulève des doutes quant à sa fonctionnalité (Gerardo *et al.*, 2010) dans la reconnaissance et l'élimination des bactéries à Gram positif.

Depuis, l'analyse de nouveaux génomes d'Aphididae a confirmé que cette absence des acteurs principaux de la voie humorale telle qu'on la connait chez d'autres insectes comme la drosophile concerne l'ensemble des pucerons (Ma *et al.*, 2022) (**Figure 13**). De manière intéressante, le séquençage d'autres génomes d'insectes a révélé que la perte de la voie IMD ne se limite pas aux pucerons, mais représente une caractéristique évolutive commune à une partie des Hémiptères (Nishide *et al.*, 2019 ; Ma *et al.*, 2022) (**Figure 14**). Plus précisément, cette perte massive concerne principalement les espèces appartenant aux aleurodes (*Bemisia tabaci*, *Trialeurodes vaporariorum*), aux cochenilles (*Planococcus citri*), ainsi qu'à d'autres Sternorrhyncha comme *Essigella californica* ou *Acanthocasuarina muellerianae*, qui, à l'instar des pucerons, présentent l'absence systématique de gènes clés de la voie IMD tels que *PGRP*, *Imd*, *dFADD*, *Dredd*, *Kenny*, *Ird5* et *Relish*, ainsi que de tous les gènes codant pour des AMP (Ma *et al.*, 2022). Cette dégradation de la voie IMD est également observée chez des espèces de l'ordre de Thysanoptera, insectes également piqueurs-suceurs proches des hémiptères (Ma *et al.*, 2022). À l'inverse, chez d'autres hémiptères appartenant principalement aux Auchenorrhyncha (comme *Cercopis vulnerata*) et aux Heteroptera (*Ranatra linearis*), la plupart des gènes de voie IMD sont mieux conservés (**Figure 14**).

Deux hypothèses principales sont proposées pour expliquer la dégradation de l'immunité humorale chez les pucerons. D'une part, ces insectes ont un régime alimentaire exclusivement phloémophage, ce qui les expose peu aux pathogènes, réduisant ainsi la pression sélective pour maintenir une défense antimicrobienne efficace (Gerado *et al.*, 2010 ; Ma *et al.*, 2022). D'autre part, ces insectes ont évolué plusieurs fois au cours de leur histoire évolutive des symbioses multi-partenaires et sont capables d'héberger plusieurs symbiotes primaires et secondaires à Gram négatif, ce qui aurait favorisé l'élimination d'une voie immunitaire susceptible de compromettre ces associations bénéfiques (Gerardo *et al.*, 2010 ; Douglas *et al.*, 2010 ; Ma *et al.*, 2022).

Thèse accessible à l'adresse : https://theses.insa-lyon.fr/publication/2025ISAL0089/these.pdf © [H. Terrasson], [2025], INSA Lyon, tous droits réservés

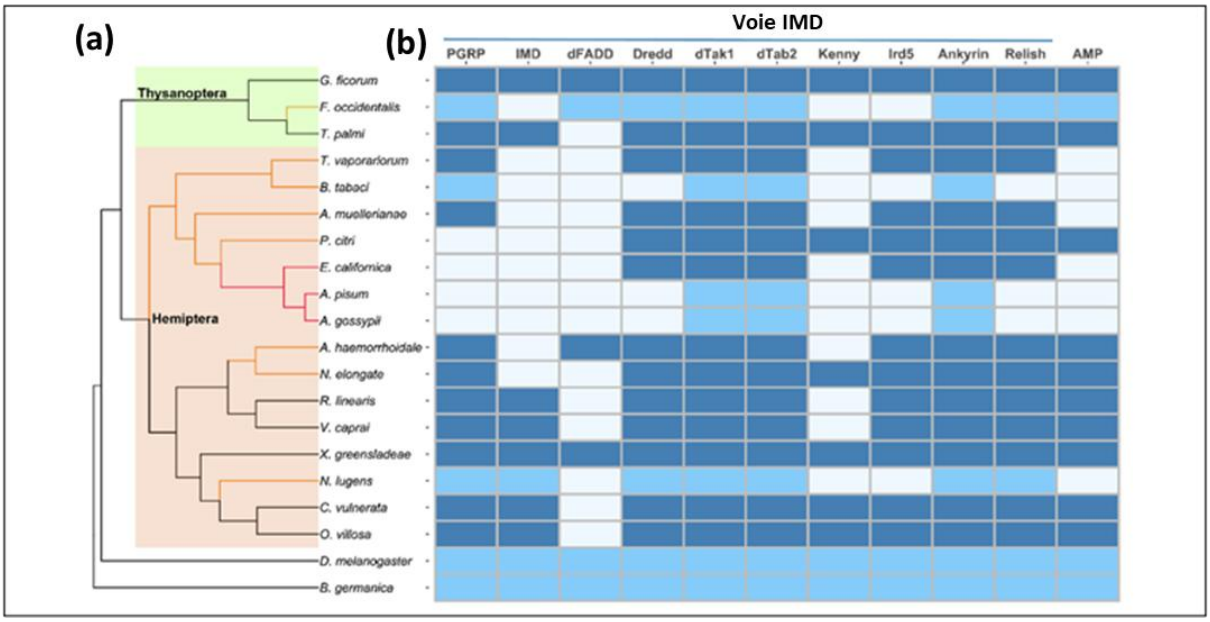


Figure 14 : Voie immunitaire IMD et des AMP chez les Hémiptères et les Thysanoptères. **(a)** Phylogénie de 18 espèces représentatives d'Hémiptères et de Thysanoptères. Une branche noire indique la présence de la majorité des gènes de la voie IMD et des AMP chez l'espèce, une branche rouge ou orange indique respectivement une absence quasi totale ou partielle de ces gènes. **(b)** Répartition des gènes principaux de la voie IMD et des AMP. Bleu foncé : orthologues présents selon les transcriptomes ; bleu clair : orthologues présents selon les génomes ; blanc : orthologues absents. *D'après Ma et al. (2022).*

Nishide *et al.* (2019) proposent une hypothèse complémentaire fondée sur l'étude de *Plautia stali* (Heteroptera), où les voies Toll et IMD présentent un chevauchement fonctionnel important. Chez cette espèce, les deux voies activent les mêmes effecteurs en réponse à des bactéries à Gram positif ou à Gram négatif, et l'inhibition de l'une ou l'autre voie suffit à réduire l'expression de AMP. Cette redondance pourrait avoir réduit la pression pour maintenir une distinction stricte entre les deux cascades, facilitant ainsi la perte progressive de la voie IMD sans altération majeure de la réponse immunitaire.

Contrairement à la voie IMD, la voie JAK/STAT est conservée chez le puceron du pois (IAGC, 2010 ; Gerardo *et al.*, 2010). Bien que les mécanismes de son implication dans la régulation de l'immunité humorale soient inconnus, le rôle immunitaire de cette voie dans la défense face aux bactéries pathogènes a bien été démontré. En effet, chez *A. pisum*, cette voie est activée en réponse à une infection par les bactéries pathogènes *E. coli*, *S. aureus*, ainsi que le champignon pathogène *Beauveria bassina* (Zhao *et al.*, 2024). De plus, toujours chez *A. pisum*, l'inactivation des gènes clés de la voie JAK/STAT (*Dome1*, *Dome2*, *Stat92E* ou *JAK*) par ARN intérférence (RNAi) réduit la résistance des individus face aux infections bactériennes par *E. coli* et *S. aureus*, (Zhao *et al.*,

Thèse accessible à l'adresse : https://theses.insa-lyon.fr/publication/2025ISAL0089/these.pdf © [H. Terrasson], [2025], INSA Lyon, tous droits réservés

2024). Une expérience similaire de challenge immunitaire couplant RNAi et exposition aux mêmes bactéries pathogènes chez *Myzus persicae*, a révélé des résultats comparables. (Ding *et al.*, 2024).

Enfin, au niveau génomique, la voie JNK est conservée chez le puceron du pois (Gerardo *et al.*, 2010 ; Ma *et al.*, 2020). Elle semble également fonctionnelle, car plusieurs de ses composants, tel que le facteur de transcription *Jra1* (homologue de *Jun* chez la drosophile), est surexprimé en cas d'infections par le pathogènes *Serratia marcescens* chez *A. pisum* (Renoz *et al.*, 2015) ainsi que d'autres gènes clés tels que *JNK*, *Jun*, *Fos* et *Puc* (respectivement homologues de *basket*, *Jra1*, *kayak* et *Puc* chez la drosophile) en cas d'infection par *Micrococcus luteus* ou *Pseudomonas aeruginosa* (Ma *et al.*, 2020, 2025).

La singularité du système immunitaire des pucerons, caractérisée notamment par l'absence de la voie IMD et d'effecteurs antimicrobiens classiques comme les peptides antimicrobiens, soulève des questions fondamentales sur la manière dont ces insectes parviennent à contrôler leur microbiote et à préserver l'équilibre de leurs associations symbiotiques. En dépit de cette immunité apparemment réduite, les pucerons et d'autres hémiptères hébergent des communautés bactériennes stables, composées de symbiotes primaires et secondaires. Cette observation suggère l'existence de mécanismes alternatifs de régulation permettant à l'hôte de maintenir l'homéostasie de ses symbiotes tout en évitant des réponses immunitaires dommageables. Ces adaptations peuvent refléter des contraintes évolutives liées à la nature des bactéries associées, à leur mode de transmission ou à leur localisation anatomique. C'est notamment le cas de la punaise des haricots Riptortus pedestris*, chez qui une classe particulière de peptides antimicrobiens, les peptides riches en cystéines spécifiques des cryptes intestinales, semble jouer un rôle clé dans la régulation fine d'un symbiote intestinal acquis de manière horizontale.*

Thèse accessible à l'adresse : https://theses.insa-lyon.fr/publication/2025ISAL0089/these.pdf © [H. Terrasson], [2025], INSA Lyon, tous droits réservés

3.2 Rôle des peptides antimicrobiens dans le contrôle des symbiotes

3.2.1 Les peptides « Crypt-specific Cysteine-Rich » chez la punaise des haricots

La punaise des haricots *R. pedestris*, un insecte hémiptère de la famille des Alydidae, est un ravageur majeur du soja en Asie (Wei *et al.*, 2023). Elle vit en association symbiotique non-obligatoire avec une Bétaprotobactérie du genre *Caballeronia* (anciennement *Burkholderia*). Cette symbiose est acquise horizontalement à chaque génération, par l'intermédiaire du sol, au deuxième stade nymphal (Kikuchi *et al.*, 2007, Kikuchi & Yumoto, 2013). Les bactéries sont logées dans la partie postérieure de l'intestin moyen, plus précisément dans la région M4 (**Figure 15**), composée de deux rangées de cryptes contenant une forte densité bactérienne (Kikuchi *et al.*, 2007).

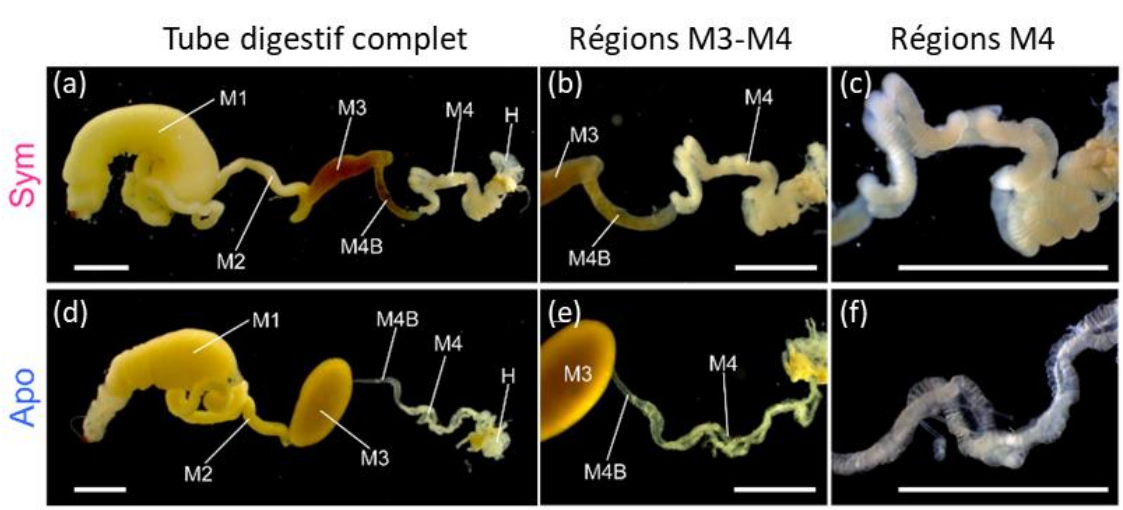


Figure 15 : Intestin moyen disséqué de *Riptortus pedestris* trois jours après la mue du cinquième stade. **(a-c)** Intestin moyen d'un insecte symbiotique (Sym). **(d-f)** Intestin moyen d'un insecte aposymbiotique (Apo). Abréviations : M1, première région de l'intestin moyen ; M2, deuxième région de l'intestin moyen ; M3, troisième région de l'intestin moyen ; M4, quatrième région de l'intestin moyen avec cryptes ; M4B, bulbe antérieur de la quatrième section de l'intestin moyen ; H, intestin postérieur. Bar = 2 mm. *D'après Futahashi et al. (2013).*

Les individus aposymbiotiques sont plus petits, ont un temps de développement plus long et une fécondité réduite (Lee *et al.*, 2017 ; Kho *et al.*, 2024), ce qui suggère un rôle déterminant du symbiote dans le métabolisme. Une étude transcriptomique récente montre que le symbiote est capable de produire l'ensemble des acides aminés essentiels et des vitamines B, et les auteurs suggèrent qu'il pourrait supplémenter son hôte en nutriments, notamment ceux

Thèse accessible à l'adresse : https://theses.insa-lyon.fr/publication/2025ISAL0089/these.pdf © [H. Terrasson], [2025], INSA Lyon, tous droits réservés

présent en faible quantité dans son alimentation (*i.e.* vitamine B12, méthionine et tryptophane) (Ohbayashi *et al.*, 2019).

Une analyse comparative des transcriptomes des intestins d'individus symbiotiques et aposymbiotiques a révélé une surexpression de 97 gènes codant des peptides riches en cystéines, nommés « Crypt-specific Cystine-Rich (CCR) », chez les individus symbiotiques (Futahashi *et al.*, 2013). Les CCR sont des peptides antimicrobiens cationiques comportant de 6 à 8 résidus cystéines capables de former des ponts disulfures et ayant une activité antibactérienne *in vitro* contre *Bacillus subtilis* (Gram positif) et *Sinorhizobium meliloti* (Gram négatif) (Futahashi *et al.*, 2013 ; Lachat *et al.*, 2024). Il est intéressant de noter que ces gènes ne sont pas surexprimés dans le corps gras des individus suite un challenge immunitaire avec les bactéries pathogènes telles que *E. coli* ou *S. aureus*, contrairement à d'autres gènes immunitaires (Lachat, 2019). Ces études soulignent la spécificité du rôle des CCRs dans la symbiose.

Récemment, Lachat *et al.* (2024) ont montré que les *Caballeronia* présentes dans le sol sont résistantes aux CCR produits par leur hôte, ce qui leur permettrait de coloniser librement le tube digestif. En revanche les bactéries sensibles sont éliminées grâce à l'action bactéricide de ces peptides. Une fois établies dans la région M4 du tube digestif, les *Caballeronia* deviennent toutefois plus sensibles aux CCR (Kim *et al.*, 2016 ; Lachat *et al.*, 2024). Bien que les mécanismes sous-jacents restent encore mal compris, il a été montré que ces symbiotes perdent les lipopolysaccharide O-antigen au niveau de leur membrane externe, une modification associée à une vulnérabilité accrue aux AMP (Kim *et al.*, 2016). Il est suggéré que cette fragilisation de la membrane des symbiotes permettrait à l'hôte d'en tirer un meilleur bénéfice, en, (i) protégeant son l'épithélium intestinal dépourvu de mucus ou de membrane péritrophique et (ii) facilitant l'import de nutriment à travers la membrane bactérienne (Mergaert *et al.*, 2017 ; Lachat *et al.*, 2024).

3.2.2 Régulation des symbiotes intracellulaires par de nouvelles familles de peptides antimicrobiens

Les travaux sur *Riptortus pedestris* montrent comment, chez les hémiptères, en l'absence de systèmes « classiques » de contrôle de l'immunité, des mécanismes alternatifs basés sur l'action de nouvelles familles de peptides

Thèse accessible à l'adresse : https://theses.insa-lyon.fr/publication/2025ISAL0089/these.pdf © [H. Terrasson], [2025], INSA Lyon, tous droits réservés

antimicrobiens (ici les CCR) ont pris le relai pour réguler les populations de symbiotes bénéfiques. Cependant, comme mentionné précédemment, de nombreux Hémiptères ne présentent aucun AMP détectable dans leur génome, et chez ceux qui en possèdent, aucune preuve directe n'indique leur implication dans la régulation des symbiotes intracellulaires, pourtant majoritaires dans ce groupe. En conséquence, les études testant expérimentalement le rôle des AMP dans ce contexte restent quasi inexistantes. Néanmoins, quelques cas documentés chez d'autres espèces symbiotiques démontrent une implication de certains AMP spécialisés dans le contrôle de symbiotes intracellulaires (revue : Mergaert & Kondorosi, 2012 ; Masson *et al.*, 2016 ; Mergeart *et al.*, 2018), ouvrant la voie à l'hypothèse que des familles spécifiques de peptides, propres à chaque lignée d'hémiptères, pourraient jouer un rôle dans cette régulation.

Dans la partie suivante, je vais présenter deux exemples de symbiotes intracellulaires dont la régulation par des AMP spécifiques de leurs hôtes respectifs a été bien décrite. Le premier exemple s'intéresse à la régulation des symbiotes chez les plantes légumineuses par les peptides « nodules-specific cysteine-rich (NCR) » ; tandis que le second exemple s'intéresse au rôle de la coléoptéricine A dans le contrôle de la symbiose chez les charançons.

Les peptides « Nodule-specific Cysteine-Rich » chez les plantes légumineuses

Les plantes légumineuses sont capables de former des organes spécialisés au niveau de leurs racines, nommés nodules, dont le rôle est d'héberger des bactéries endosymbiotiques fixatrice d'azote du genre *Sinohizobium* (Jones *et al.*, 2007). Ces bactéries réduisent l'azote atmosphérique en ammonium, afin de satisfaire les besoins en azote de la plante hôte (Prell & Poole, 2006). De manière similaire aux pucerons, une fois à l'intérieur du nodule, les bactéries sont individuellement entourées d'une membrane d'origine végétale, appelée membrane symbiosomale. Cette symbiose se met en place lorsque la teneur en azote dans le sol n'est pas suffisante pour le développement de la plante. En réponse, la plante sécrète des flavonoïdes dans la rhizosphère, ce qui induit chez les *Rhizobium* l'expression et la libération de molécules signals, appelées facteurs Nod. Alors, les plantes déclenchent à leur tour le développement des nodosités ainsi que le processus d'infection par les bactéries symbiotiques (Kondorosi *et al.*, 2013).

Thèse accessible à l'adresse : https://theses.insa-lyon.fr/publication/2025ISAL0089/these.pdf © [H. Terrasson], [2025], INSA Lyon, tous droits réservés

Une particularité des légumineuses appartenant au clade des IRCL (i.e. « inverted repeat–lacking clade ») est que leurs bactéries endosymbiotiques présentent des caractéristiques distinctes de leurs homologues libres du sol : elles subissent une différenciation morphologique marquée par une élongation cellulaire, une amplification du génome, des modifications membranaires entraînant une perméabilité accrue, ainsi qu'une perte de leur capacité à se diviser (Mergaert *et al.*, 2006 ; Farkas *et al.*, 2014). Les bactéries ainsi différenciées sont appelées « bactérioïdes » (**Figure 16a**).

Une comparaison du transcriptome des nodules de plantes IRCL (comme *Medicago truncatula)* avec celui de plante non-IRCL (comme *Lotus japonicus*) a permis d'identifier des gènes de l'hôte potentiellement impliqués dans la différenciation terminale des bactéroïdes dans les nodules de *M. truncatula* (Mergeart *et al.*, 2003). La plupart des gènes exprimés uniquement chez cette espèce codent des peptides qui partagent des caractéristiques structurelles avec les AMP de type défensine : ce sont en petits peptides (60-100 acides amniés), riches en cystéines (4 ou 6) et dotés d'un peptide signal. De plus ils sont exprimés spécifiquement dans les nodules, représentant à eux seuls 5% du transcriptome de ces organes (Mergeart *et al.*, 2003). Par la suite, Van de Velde *et al.* (2010) ont démontré le rôle crucial des NCR dans la différenciation des *rhizobia* en bactérioïdes. En produisant un mutant *M. truncatula* « *dnf1-1* » déficient pour un gène codant une sous-unité du complexe de la signal peptidase (SPC, *Signal Peptidase Complex*), ils ont mis en évidence l'importance de la voie de sécrétion dans le transport des NCR. Le SPC réside dans le réticulum endoplasmique (RE) et permet le clivage du peptide signal des protéines secrétées, une étape indispensable pour leur transport vers les compartiments cibles, ici le transport des NCR à travers la membrane symbiosomale (Wang *et al.*, 2010 ; Yang et al., 2023). Les NCR sont bien exprimés mais sont retenus dans le RE les empêchant de remplir leur fonction. En conséquence, dans les nodules des mutants *dnf1-1*, les bactéries sont présentes mais restent indifférenciées (**Figure 16b**).

De manière encore plus marquante, des mutants de *L. japonicus* (non-IRCL) ont été produits afin qu'ils soient capables d'exprimer certains NCR, puis ont été infectés naturellement par les *rhizobia*. Celles-ci comportaient des bactéries présentant des débuts de différenciations, comme une élongation et une perméabilisation de leur membrane, en particulier celles exprimant le NCR035

Thèse accessible à l'adresse : https://theses.insa-lyon.fr/publication/2025ISAL0089/these.pdf © [H. Terrasson], [2025], INSA Lyon, tous droits réservés

(Van de Velde *et al.*, 2010) (**Figure 16c**). Ces résultats suggèrent que l'expression de NCR chez des plantes qui n'en produisent normalement pas est suffisante pour induire une réponse morphologique chez le symbiote, soulignant le rôle direct de ces peptides dans l'initiation du processus de différenciation bactérienne.

Par la suite, Farkas *et al.* (2014) ont montré que NCR247 était capable de pénétrer la membrane de la bactérie et d'interagir avec plusieurs protéines bactériennes clés. Par exemple, NCR247 interagit avec (i) FtsZ, qui est impliqué

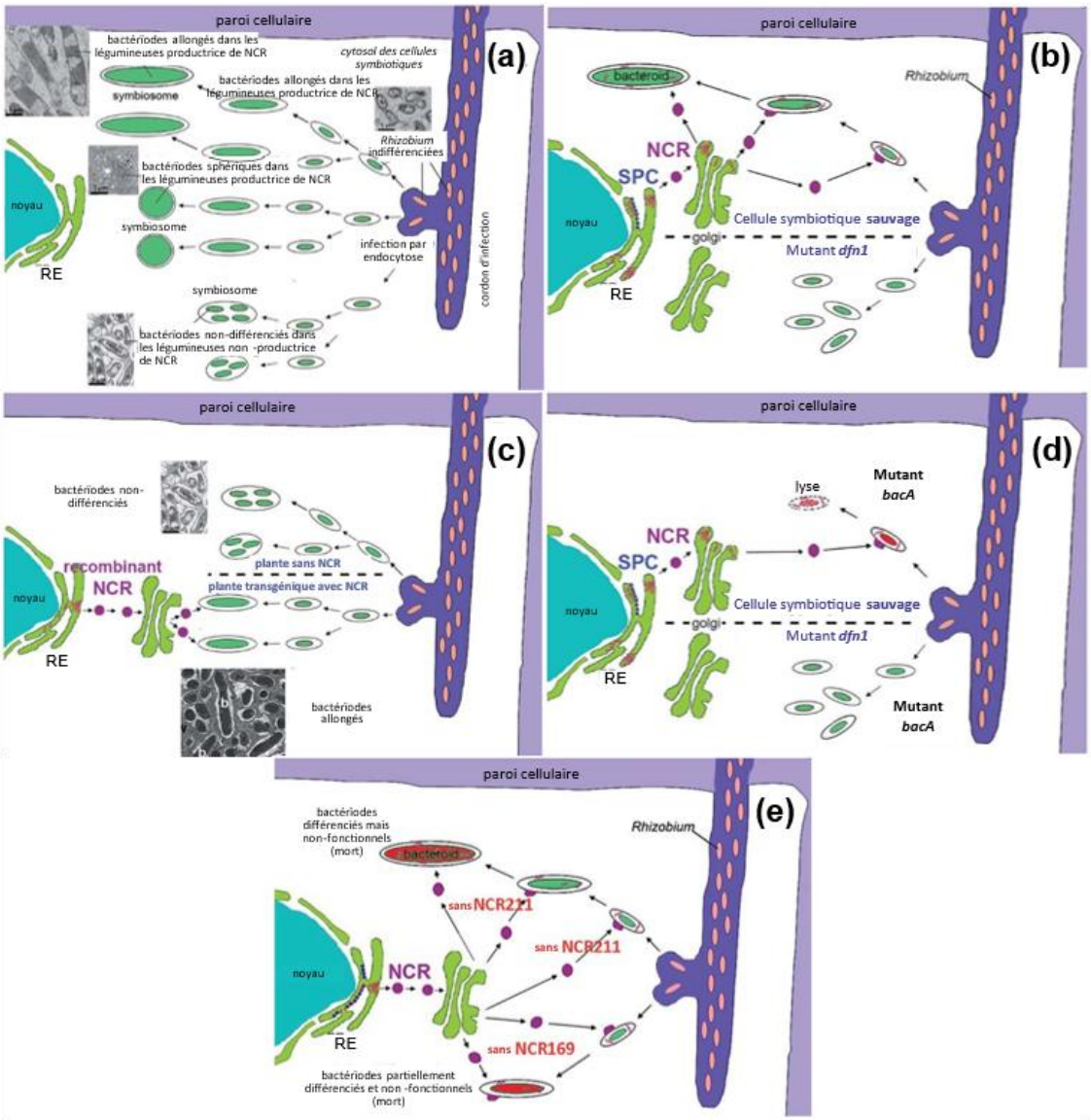


Figure 16 : Différenciation des rhizobiums endosymbiotiques induite par les peptides NCR dans les cellules nodulaires des légumineuses. (a) Différenciation des rhizobiums chez les légumineuses produisant ou non des peptides NCR. **(b)** Le blocage du transport des NCR chez le mutant *dnf1* du complexe de la signal peptidase (SPC) est corrélé à la formation de bactéroïdes non différenciés ; les NCR restent bloqués dans le RE. **(c)** L'expression des gènes NCR de *Medicago truncatula* dans les nodules de la légumineuse *Lotus japonicus* (qui ne produit pas de NCR) induit la différenciation partielle des rhizobium en bactéroïdes. **(d)** Le mutant *bacA* de *Sinorhizobium meliloti*, hypersensible aux peptides NCR, meurt lorsqu'il est relâché dans une cellule symbiotique sauvage productrice de NCR. En revanche, il survit chez le mutant *dnf1* qui ne transporte pas les peptides NCR vers les bactéries. **(e)** Les peptides NCR169 et NCR211 sont essentiels à la différenciation et la survie des symbiotes, respectivement.

Thèse accessible à l'adresse : https://theses.insa-lyon.fr/publication/2025ISAL0089/these.pdf © [H. Terrasson], [2025], INSA Lyon, tous droits réservés

dans la formation d'un septum, crucial dans la division bactérienne, (ii) les ribosomes, cruciaux dans la traduction des protéines et (iii) GroEL, une protéine chaperonne. Cette dernière interaction pourrait permettre à l'hôte de manipuler certaines fonctions cellulaires du symbiote, contribuant à sa différenciation terminale. Des bactéries *Sinorhizobium meliloti* traitées *in vitro* avec le peptide NCR247 subissent également une modification de leur membrane, une réplication forte de leur ADN accompagnées d'une élongation (Van de Velde., 2010 ; Haag *et al.*, 2011). NCR247 possède également une forte activité bactéricide, exacerbée en l'absence du transporteur bacA au niveau de la paroi bactérienne. *In vivo*, les *S. meliloti* mutantes pour *BacA* sont capables de coloniser les nodules mais ne parviennent pas à y persister, étant rapidement éliminées par l'action des NCR (Haag *et al.*, 2011) (**Figure 16d**). Ce transporteur, homologue au SbmA de *E. coli*, importe un large spectre de peptides, et pourrait faciliter l'internalisation des NCR dans le cytoplasme de la bactérie réduisant leur accumulation à la membrane et par conséquent leur toxicité. La plante pourrait sélectionner spécifiquement les rhizobia exprimant ce gène, réduisant ainsi le spectre des bactéries capables d'infecter ses racines (Mergaert, 2018).

D'autres NCR présentent des fonctions spécifiques : (Roy *et al.*, 2020), par exemple NCR169 joue un rôle analogue à NCR247 dans la différenciation des bactérioïdes (Horváth *et al.*, 2015), tandis que NCR211 est associé à leur maintien et à leur survie (Kim M. *et al.*, 2015) (**Figure 16e**). En revanche Les NCR122 et NCR218 sont exprimés dans les racines même en absence de bactérioïdes, suggérant un rôle en amont dans la formation des nodosités. Par ailleurs, tous les NCR ne sont pas tous exprimés aux mêmes stades ni dans les mêmes zones des nodules, soulignant la diversité fonctionnelle acquise au cours de l'évolution. (Roux *et al.*, 2014 ; Marx *et al.*, 2016).

Enfin, d'autres plantes que les légumineuses sont capables d'établir des symbioses avec des bactéries fixatrices d'azotes. C'est de cas de l'aulne glutineux, *Alnus glutinosa*, un arbre de la famille des Bétulacées, dont les des nodules racinaires abritent des actinobactéries du genre *Frankia*. Similairement aux Légumineuses, des analyses transcriptomiques ont révélé l'expression spécifiques de peptides similaires aux défensines dans les nodules de Bétulacées infectées par *Frankia* (Hocher *et al.*, 2011 ; Demina *et al.*, 2013). Les chercheurs ont montré

Thèse accessible à l'adresse : https://theses.insa-lyon.fr/publication/2025ISAL0089/these.pdf © [H. Terrasson], [2025], INSA Lyon, tous droits réservés

qu'au moins un de ces peptides, Ag5, ciblait *Frankia sp.*, en augmentant la perméabilité de sa membrane. Ce mécanisme faciliterait la libération des métabolites produits par la bactérie, notamment la glutamine et le glutamate, au profit de la plante hôte (Carro *et al.*, 2015).

Tous ces éléments montrent qu'il existe une diversité fonctionnelle exceptionnelle des AMP dans les associations plantes-bactéries et leur importance évolutive déterminante dans le contrôle des symbiotes afin de maximiser la fitness de l'hôte (Montiel *et al.*, 2017 ; Mergaert, 2018). Ils nous suggèrent aussi que nos connaissances sur la diversité des AMP chez les insectes sont encore, en comparaison, étonnamment limitées.

Le peptide « Coleoptéricine A » chez le Charançon

Les insectes du genre *Sitophilus* (charançons du riz, du maïs et du blé) sont des coléoptères, spécialisés dans l'infestation des graines de céréales. Les femelles de ce genre pondent directement dans les graines, et les larves s'en nourrissent pour s'y développer (Abedi *et al.*, 2024). Ces espèces vivent en association obligatoire avec *Sodalis pierantonius*, une bactérie intracellulaire qui fournit à son hôte des vitamines (notamment du groupe B) et des acides aminés (notamment la tyrosine et la phénylalanine) absents de leur alimentation (Wicker, 1983 ; Heddi *et al.*, 1993 ; Vigneron *et al.*, 2014). Ces acides aminés sont essentiels dans la construction de la cuticule des insectes au moment de la métamorphose *S. pierantonius* vit dans les bactériocytes, regroupés en bactériomes, localisés à l'apex des caecum mésentériques du tube digestif et dans les ovaires (Maire *et al.*, 2020).

Une analyse transcriptomique comparant des larves symbiotiques et aposymbiotiques a mis en évidence l'expression spécifique des ARN messagers (ARNm) codant la coléoptéricine A (*colA*), un peptide antimicrobien exprimé de façon constitutive dans les bactériomes des charançons. Malgré la présence massive de bactéries dans cet organe, aucun autre AMP du charançon (*e.g.* diptericin-like, peptides riches en glycines, sarcotoxine ou encore la coléoptéricine B) n'est exprimé de manière constitutive dans le bactériome (Anselme *et al.*, 2008). L'inactivation fonctionnelle du gène *colA* par RNAi entraine la sortie des symbiotes, à l'extérieur des bactériocytes, suggérant qu'il joue un rôle actif dans leur confinement (Login *et al.*, 2011). En effet, ColA est

Thèse accessible à l'adresse : https://theses.insa-lyon.fr/publication/2025ISAL0089/these.pdf © [H. Terrasson], [2025], INSA Lyon, tous droits réservés

capable d'inhiber la division cellulaire bactérienne sans perturber la réplication de l'ADN, menant à la formation de cellules bactériennes géantes, polyploïdes et métaboliquement actives. Cette population de bactéries symbiotiques géantes et actives, isolées chez des larves de charançons, est significativement moins abondante en cas d'inactivation de *colA* (48,3% chez les témoins contre 4,72% chez les traités) (Login *et al.*, 2011). Bien que son mode d'action exact reste à élucider, sa capacité à pénétrer dans le cytoplasme des symbiotes et d'interagir avec la protéine bactérienne chaperonne GroEL (Login *et al.*, 2011) démontre une action directe du peptide sur le symbiote. Il est intéressant de noter qu'une autre coléoptéricine, ColB, est relativement similaire ColA (42% d'identité de séquence en acides aminés) et possède une activité bactéricide *in vitro* contre *E. coli* (Login *et al.*, 2011). Pourtant ColB n'est pas capable d'interagir avec GroEL et n'est pas exprimé dans les bactériomes du charançon (Login *et al.*, 2011 ; Galambos *et al.*, 2024).

De manière intéressante, Ferrarini *et al.* (2022) ont montré que le confinement du symbiote dans les bactériocytes permettait à celui-ci d'échapper à la détection par le système immunitaire de l'hôte. En effet, chez le charançon *S. oryzae*, l'injection de TCT (tracheal cytotoxin) dans l'hémolymphe, un fragment de peptidoglycane dérivé du symbiote *S. pierantonius*, est suffisante pour activer la réponse immunitaire de l'hôte. Cette activation a lieu à la fois dans le corps gras et dans le bactériome, et aboutit la production d'AMP (coléoptéricine a et b, AMP riches en glycine, diptericine-like), qui sont ensuite libérés dans l'hémolymphe pour combattre l'infection (Maire *et al.*, 2019 ; Ferrari *et al.*, 2022). Toutefois, ce challenge immunitaire ne modifie pas le transcriptome du symbiote (Ferrarini *et al.*, 2022), ce qui suggère qu'il n'est pas impacté par la réponse immunitaire de son hôte. En effet, bien que cette réponse immunitaire soit initiée à partir d'un signal symbiotique (le TCT), les AMP surexprimés dans le corps gras et le bactériome sont détectés par immunolocalisation uniquement à l'extérieur du bactériome, et s'accumulent dans l'hémolymphe (**Figure 17**) (Ferrarini *et al.*, 2022). Seul le peptide ColA demeure présent dans le bactériome, que les charançons soient challengés (injection de TCT) ou non (témoin négatif), ce qui montre la particularité de ce

Thèse accessible à l'adresse : https://theses.insa-lyon.fr/publication/2025ISAL0089/these.pdf © [H. Terrasson], [2025], INSA Lyon, tous droits réservés

peptide par rapport aux autres AMP du charançon et de son rôle spécifique dans la symbiose.

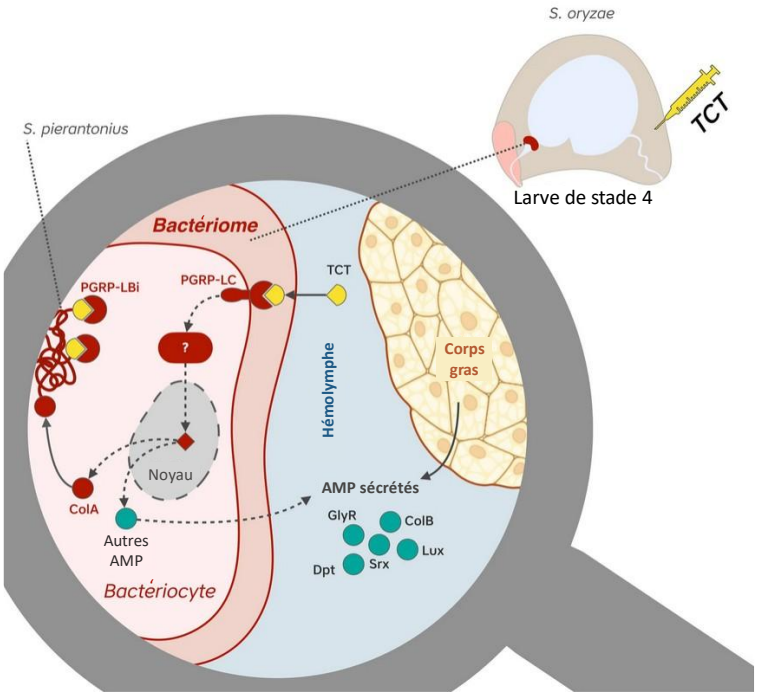


Figure 17 : Mécanismes proposés de la réponse au défi TCT au sein des bactériomes de *S. oryzae*. Le TCT injecté dans l'hémolymphe atteint les bactériomes et est reconnu par le récepteur PGRP-LC des bactériocytes. Par une cascade de signalisation potentiellement dépendante des protéines IMD/RELISH, les bactériocytes déclenchent une induction d'AMP, dont la majorité (ColB, Srx, Lux, AMP riches en glycine, Dpt-2, Dpt-3 et Dpt-4) seraient sécrétés afin de participer à la réponse immunitaire globale, mais aucun effecteur n'est perçu par les bactéries à l'intérieur des bactériomes. Les AMP sont également produits par le tissu adipeux et sécrétés dans l'hémolymphe. ColA, en revanche, est retenu dans les bactériocytes pour empêcher *S. pierantonius* de sortir des cellules hôtes durant ce défi immunitaire. *D'après Ferrarini et al. (2022).*

Une fois la cuticule formée, à partir du stade adulte D7, le charançon initie l'élimination de ses symbiotes intestinaux devenus inutiles et coûteux (Vigneron *et al.*, 2014). Cette dégradation s'opère dans les bactériocytes *via* l'activation coordonnée de l'apoptose (mort cellulaire programmée) et de l'autophagie (processus de recyclage intracellulaire par les lysosomes), comme le montrent des analyses transcriptomiques et des observations histologiques (Vigneron *et al.*, 2014 ; Ferrarini *et al.*, 2023). Cette élimination progresse au cours des jours suivants, jusqu'à disparition complète des symbiotes vers D14.

Les études présentées dans la partie 3 de l'Introduction illustrent la diversité des mécanismes moléculaires permettant aux hôtes de contrôler leurs associés microbiens. Elles montrent aussi que l'immunité innée chez les insectes est le régulateur majeur de ces associations, intervenant autant dans le contrôle

Thèse accessible à l'adresse : https://theses.insa-lyon.fr/publication/2025ISAL0089/these.pdf © [H. Terrasson], [2025], INSA Lyon, tous droits réservés

des pathogènes que du microbiote ou des symbiotes. Toutefois, ces connaissances reposent principalement sur quelques espèces modèles et les études récentes chez les hémiptères et d'autres insectes symbiotiques suggèrent que des familles de peptides antimicrobiens propres auraient pu évoluer de manière spécifique à chaque groupe d'insecte. Dans ce contexte, le cas des pucerons représente une situation singulière et encore peu explorée, que j'approfondirai dans le prochain chapitre.

Thèse accessible à l'adresse : https://theses.insa-lyon.fr/publication/2025ISAL0089/these.pdf © [H. Terrasson], [2025], INSA Lyon, tous droits réservés

4 Régulation des symbiotes chez les pucerons

Nonobstant la présence de voies immunitaires fortement dégradées, une régulation des symbiotes est bien présente chez les pucerons et est active vis-à-vis des symbiotes secondaires (facultatifs) et des symbiotes obligatoires, comme le montrent les études suivantes.

4.1 Régulation des symbiotes facultatifs

Chez les pucerons, le contrôle des symbiotes facultatifs est encore très mal connu. On sait cependant qu'ils ont une influence sur l'immunité cellulaire de leur hôte (Laughton *et al.*, 2016). Ainsi, les lignées hébergeant les symbiotes facultatifs *R. insecticola* et *H. defensa*, possèdent moins d'hémocytes circulants par rapport aux lignées mono-symbiotiques ou porteuses de *S. symbiotica* (Schmitz *et al.*, 2012). Ce résultat est en accord avec la baisse de l'activité phénoloxydase (PO) observée chez les lignées infectées par *R. insecticola* ou *H. defensa*. Ces lignées se révèlent plus sensibles aux pathogènes, probablement dû à la baisse constitutive de leur immunité (Luo *et al.*, 2021).

Chez les différents clones testés par Shmitz *et al.* (2012), des signes de phagocytoses sont observés, et des symbiotes facultatifs sont retrouvés à l'intérieur des hémocytes. Cependant, aucun symbiote facultatif ne présente de signes de dégradation, contrairement aux bactéries pathogènes (*E. coli*) injectées. Même lorsque le symbiote primaire *B. aphidicola*, est sporadiquement détecté dans l'hémolymphe, il est pris en charge par les hémocytes (Shmitz *et al.*, 2012).

Chez le puceron noir de la fève, *Aphis fabae,* différentes souches du symbiote facultatif *H. defensa* peuvent être hébergées. Parmi elles, la souche H85 a la particularité de proliférer énormément et atteint des densités largement supérieures à d'autres souches comme H15 (Kaech *et al.*, 2021). Une analyse transcriptomique a révélé que cette souche induit une sous-expression de l'hémocytine (un homologue d'un marqueur hémocytaire chez la drosophile) suggérant qu'elle réduit la réponse cellulaire de son hôte (Kaech *et al.*, 2021). De manière similaire, une souche prolifératives de *R. insecticola* chez *A. pisum*

Thèse accessible à l'adresse : https://theses.insa-lyon.fr/publication/2025ISAL0089/these.pdf © [H. Terrasson], [2025], INSA Lyon, tous droits réservés

est également associée à une sous-expression de l'hémocytine (Goldstein *et al.*, 2023).

Concernant la réponse humorale du puceron face aux symbiotes facultatifs, les données disponibles sont encore très limitées. Une étude comparant le transcriptome d'une lignée mono-symbiotique et d'une lignée porteuse de *S. symbiotica* montre un très faible impact de la présence du symbiote secondaire sur l'expression des gènes de l'hôte (Burke & Moran 2011). Aucun gène lié aux voies IMD, Toll ou JAK/STAT n'y est significativement surexprimé.

Cependant, Kaech *et al.* (2021) montrent que la souche d'*H. defensa* la moins proliférative de leur étude (H15) est associée à une sous-expression du gène « ubiquitin-related modifier 1 » (*urm1*) chez *A. fabae* un gène identifié pour inhiber la voie JNK chez la drosophile (Khoshnood *et al.*, 2015). Par ailleurs, comme mentionné précédemment, le gène *jra1* (facteur de transcription liée à la voie JNK) est surexprimé en cas d'infection avec un pathogène du genre *Serratia* (Renoz *et al.*, 2015). Ces résultats suggèrent que la voie JNK pourrait être impliquée dans le contrôle de certains symbiotes facultatifs. Cependant, aucun autre gène de la voie JNK n'est significativement surexprimé chez *A. fabae* naturellement infecté par la souche H15 (Kaech *et al.*, 2021) et le gène *jra1* n'est pas surexprimé en cas d'ingestion d'une souche libre de *S. symbiotica*, pourtant génétiquement proche du symbiote facultatif homonyme (Renoz *et al.*, 2015). Ensemble, ces observations suggèrent que la voie JNK joue probablement un rôle central dans la défense immunitaire contre les pathogènes ainsi que dans la régulation des certains symbiotes facultatifs, mais pas tous. Le rôle exact de cette voie chez les pucerons reste donc à clarifier.

4.2 Dynamique de régulation des bactérioytes et de *Buchnera* dans les lignées mono-symbiotiques

Le modèle *Buchnera*/puceron du pois a été le premier pour lequel les dynamiques couplées de croissance et de dégradation des bactériocytes et des symbiotes ont été définies tout au long du cycle de vie de l'insecte, en commençant par les stades embryonnaires tardifs jusqu'aux stades adultes âgés. Dans une première étude, Simonet *et al.* (2016b) ont montré que le nombre de

Thèse accessible à l'adresse : https://theses.insa-lyon.fr/publication/2025ISAL0089/these.pdf © [H. Terrasson], [2025], INSA Lyon, tous droits réservés

bactériocytes augmente exponentiellement tout au long du développement nymphal, jusqu'au stade jeune adulte (A9). À partir de ce stade, le puceron entre en phase de ponte parthénogénétique et la quantité de bactériocytes ainsi que celles de *B. aphidicola* commence à diminuer progressivement. L'observation de coupes histologiques de pucerons à différents stades nymphaux, colorées à l'hémalun-éosine (marqueurs des noyaux et du cytoplasme, respectivement), révèle que le cytoplasme des bactériocytes est presque entièrement occupé par *B. aphidicola*. En revanche, dès le stade adulte (A9), ces cellules présentent de larges zones à faible densité symbiotique, qui s'accumulent et deviennent de plus en plus étendues au fil du vieillissement du puceron (Simonet *et al.*, 2016b, 2018).

L'étude cellulaire des processus associés a montré que, dès le stade adulte, le bactériocyte est soumis à un stress trouvant son origine dans le réticulum endoplasmique, ce qui provoque l'accumulation de larges vacuoles dans le cytoplasme cellulaire (Simonet *et al.*, 2018). Ce sont ces vacuoles qui occupent largement les zones à faible densité symbiotique. (**Figure 18**).

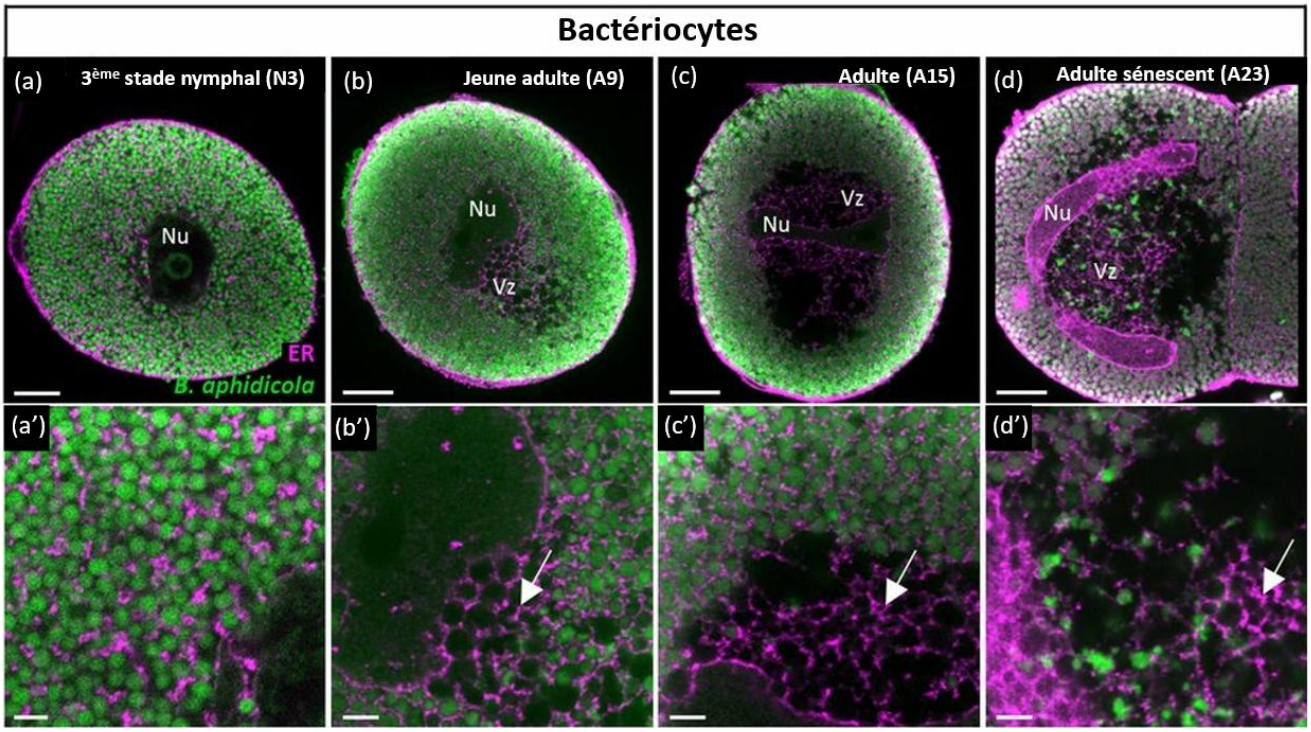


Figure 18 : Le réticulum endoplasmique à l'origine de l'hypervacuolisation des bactériocytes dégénératifs. (a-d') Images en microscopie confocale de bactériocytes entiers prélevés chez *A. pisum* et **(a'-d')** vues agrandies. **(a et a')** Bactériocytes de nymphes au stade 3 (N3), **(b et b')** de jeune adultes jeunes (A9), **(c et c')** d'adultes en phase de reproduction (A15) et **(d et d')** de pucerons sénescents. Le RE (magenta) et les symbiotes *B. aphidicola* (vert) ont été marqués respectivement avec les anticorps anti-KDEL et anti-GroEL de *Buchnera*. Les flèches blanches indiquent le marquage RE+ dans la zone vacuolaire des bactériocytes dégénératifs. Celui-ci forme un réseau réticulé entourant les symbiotes. Nu : noyau ; Vz : zone dense en vacuoles. (Bar : 20 µm dans (a-d), 5 µm dans (a'-e'). *Adapté de Simonet et al. (2018).*

Thèse accessible à l'adresse : https://theses.insa-lyon.fr/publication/2025ISAL0089/these.pdf © [H. Terrasson], [2025], INSA Lyon, tous droits réservés

Simonet *et al.* (2018) montrent que cette hypervacuolisation déclenche une série de modifications cellulaires, incluant, à partir du stade A9, des signes de mort cellulaire, comme le gonflement des mitochondries, une autophagie et la production d'espèces réactives de l'oxygène (ROS). Cette mort cellulaire ne présente aucun des signes distinctifs de l'apoptose comme la condensation de la chromatine, la désorganisation du nucléole et la fragmentation du noyau (**Figure 19**). En dernière étape, cette mort cellulaire présente une dégradation massive des bactéries symbiotiques par le système lysosomial de la cellule (**Figure 20**). Bien que l'induction de l'expression de certains gènes clés du système lysosomiale dans les bactériocytes soient détectés dès le stade A9 et A15 (**Figure 20f**), très peu de lysosomes sont visibles à ces stades (**Figure 20b-d'**), contrairement au stade A23 (**Figures 20e-e', g**). Les observations au microscope électronique, qui révèlent des *Buchnera* en cours de dégradation dans des structures lysosomales dans des bactériocytes de pucerons sénescents confirment cela (Simonet *et al.*, 2018).

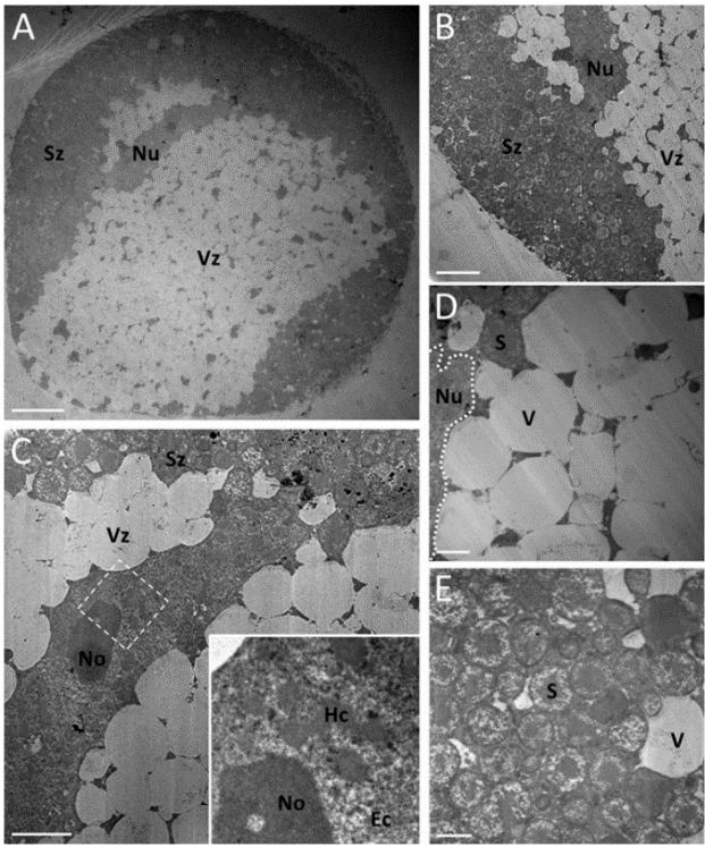


Figure 19 : Observation en microscopie électronique à transmission (MET) de bactériocytes dégénératifs chez *A. pisum*. **(A)** Image à faible grossissement d'un bactériocyte dégénératif montrant une vacuolisation cytoplasmique étendue et une morphologie nucléaire anormale. **(B)** Vue agrandie de la frontière entre la zone cytoplasmique périphérique, remplie de symbiotes *B. aphidicola*, et la zone centrale fortement vacuolisée s'étendant autour du noyau. **(C)** Vue agrandie du noyau du bactériocyte montrant une perte de sa forme arrondie mais sans modification ultrastructurale majeure. (Encart) Vue agrandie des structures chromatiniennes et du nucléole. (Grossissement de l'encart : ×6,4). À noter : absence des caractéristiques typiques de l'apoptose, telles que la condensation de la chromatine, la fragmentation nucléaire ou la formation de corps apoptotiques. **(D et E)** Vues agrandies de grandes vacuoles cytoplasmiques électrolucides (D) et de symbiotes *B. aphidicola* (E). Ec, euchromatine ; Hc, hétérochromatine ; No, nucléole ; Nu, noyau ; S, symbiote ; Sz, zone dense en symbiotes ; V, vacuole ; Vz, zone dense en vacuoles. (Barres = 20 µm pour A, 10 µm pour B, 5 µm pour C, et 2 µm pour D et E.).

Thèse accessible à l'adresse : https://theses.insa-lyon.fr/publication/2025ISAL0089/these.pdf © [H. Terrasson], [2025], INSA Lyon, tous droits réservés

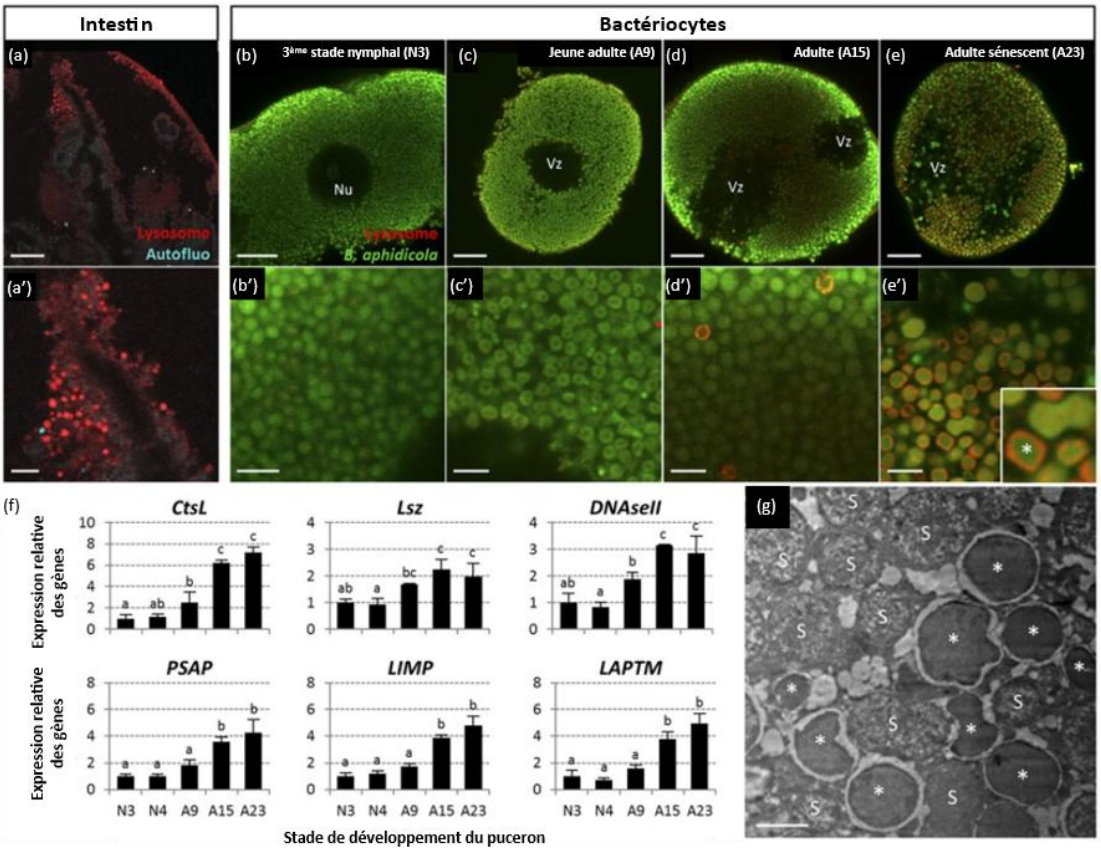


Figure 20 : Activation du système lysosomal au cours de la dégénérescence des bactériocytes chez le puceron. (A–E′) Images en microscopie confocale **(A–E)** et vues agrandies **(A′–E′)** des lysosomes dans des préparations en montage entier de tubes digestifs (contrôles ; A et A′) et de bactériocytes prélevés respectivement aux stades N3 (B et B′), jeunes adultes (C et C′), adultes en phase de reproduction (D et D′) et pucerons sénescents (E et E′). Les symbiotes *B. aphidicola* (en vert) et les lysosomes (en rouge) ont été marqués respectivement avec les anticorps anti-GroEL de *Buchnera* et anti-RAB7. (Encart de E) Vue agrandie montrant une membrane lysosomale entourant un symbiote *B. aphidicola*. Les symbiotes *B. aphidicola* (astérisques) sont ici internalisés dans des lysosomes dans les bactériocytes dégénératifs. (Grossissement de l'encart : ×5,3). À noter : dans les bactériocytes dégénératifs (D et E), les signaux positifs aux lysosomes sont observés uniquement dans les zones riches en symbiotes, et non dans les zones riches en vacuoles. Nu : noyau ; Vz : zone dense en vacuoles. (Barres d'échelle : 20 µm pour A–E, et 5 µm pour A′–E′). (F) Induction de l'expression de gènes lysosomiaux dans les bactériocytes au cours du vieillissement du puceron révélée par qRT-PCR. Profils d'expression de gènes représentatifs des principales fonctions lysosomiales : hydrolases acides lysosomiales (CtsL), glycosidases (Lsz), nucléases (DNaseII), activateurs (PSAP), protéines membranaires majeures (LIMP) et mineures (LAPTM). Les niveaux d'expression des gènes dans les bactériocytes à différents stades de vie sont exprimés relativement au niveau du troisième stade nymphal. Le gène *rpl7* a été utilisé pour la normalisation. Les résultats sont présentés sous forme de moyennes ± écart-type (barres d'erreur) issues de trois expériences indépendantes. Les données ont été analysées par ANOVA à un facteur suivie d'un test post hoc de comparaisons multiples (test HSD de Tukey). Les stades de vie marqués par des lettres différentes sont significativement différents ($P < 0,05$). Noms des gènes : CtsL : cathepsine-L ; DNaseII : DNase II ; LAPTM : protéine transmembranaire associée aux lysosomes ; LIMP : protéine membranaire lysosomale intégrale ; Lsz : lysozyme i-1 ; PSAP : prosaposine. A9, A15, A23 correspondent aux stades adultes aux jours 9, 15 et 23 respectivement ; N3 et N4 aux troisièmes et quatrièmes stades nymphaux. (G) Image représentative en microscopie électronique à transmission (MET) de lysosomes contenant des symbiotes *B. aphidicola* (astérisques) dans des bactériocytes dégénératifs (A23). Les symbiotes intacts sont marqués par un "S". (Barre d'échelle : 2 µm).

Ces résultats montrent que la dégénérescence des bactériocytes chez le puceron du pois s'opère sans déclenchement effectif de l'apoptose, malgré la présence de certains composants de la voie. En effet, le génome d'*A. pisum* code un répertoire réduit et singulier de caspases : deux initiateurs (Ap-Dronc-1 et Ap-Dronc-2) et quatre effecteurs (Ap-ICE-1, Ap-ICE-2, Ap-Decay-1, Ap-Decay-2),

Thèse accessible à l'adresse : https://theses.insa-lyon.fr/publication/2025ISAL0089/these.pdf © [H. Terrasson], [2025], INSA Lyon, tous droits réservés

issus de duplications, mais dépourvus de certains homologues clés présents chez *Drosophila*, comme *Damm*, *Dredd* ou *Strica*. L'analyse d'expression révèle que ces caspases ne sont pas activées aux stades précoces du processus dégénératif (stade A9), et que leur induction est retardée, n'intervenant que tardivement chez les adultes sénescents (A15–A23), c'est-à-dire bien après l'installation du stress vacuolaire. Il est également probable que certaines caspases, comme Ap-Dronc-1, dont le domaine catalytique présente des substitutions d'acides aminés critiques, soient fonctionnellement atténuées, voire non fonctionnelles en tant qu'initiateur de l'apoptose (Simonet *et al.*, 2018 ; Ribeiro Lopes *et al.*, 2020).

De plus, cette induction des caspases reste modérée et coïncide avec une élévation parallèle de l'expression de plusieurs inhibiteurs d'apoptose (IAP), ce qui suggère un verrouillage actif de la voie apoptotique malgré un contexte de stress cellulaire important. Dans ce contexte, la forte expansion du répertoire d'IAP chez *A. pisum*, révélée par Ribeiro Lopes *et al.* (2020), prend une importance fonctionnelle majeure. En tout, 28 gènes IAP ont été identifiés (contre seulement 4 chez *Drosophila*), dont plusieurs (Ap-iap-A1, A2, A4, B1, Deterin-1) sont spécifiquement exprimés dans les bactériocytes et exprimés de manière croissante au cours du vieillissement du puceron. Ces IAP, dont certains présentent des architectures structurales inédites, ont une capacité démontrée à bloquer l'apoptose *in vivo* (Ribeiro Lopes *et al.*, 2020). Leur expression, qui coïncide précisément avec la progression du stress intracellulaire, soutient l'hypothèse selon laquelle ils permettent la survie prolongée des bactériocytes en inhibant l'entrée dans une mort apoptotique. Cela permettrait au puceron de préserver une quantité raisonnable de bactériocytes et de symbiotes indispensables à sa survie, même dans des stades post-reproductifs (au-delà du stade A23).

Ce type de mort cellulaire des bactériocytes diffère de celui observé chez le charançon (cf Chapitre 3), et pose la question d'un système propre aux pucerons ou plus largement aux hémiptères, comme le suggère le répertoire réduit des caspases et l'expansion des IAP identifiés chez d'autres espèces de pucerons (Ribeiro Lopes et al., 2020). Se pose également la question de l'implication potentielle d'autres types d'effecteurs, identifiés récemment et

Thèse accessible à l'adresse : https://theses.insa-lyon.fr/publication/2025ISAL0089/these.pdf © [H. Terrasson], [2025], INSA Lyon, tous droits réservés

présentés dans la partie suivante, dans ce processus de dégénérescence des bactériocytes.

4.3 Les peptides « Bacteriocytes-specific Cysteine-Rich (BCR) » chez le puceron du pois

4.3.1 Découverte des BCR et expression spécifique aux bactériocytes

La seconde avancée majeure dans la compréhension de la régulation symbiotique chez *A. pisum* a été apportée par les travaux de Shigenobu & Stern (2013). Grâce à une analyse transcriptomique par RNA-seq sans *a priori*, ces auteurs ont comparé l'expression des gènes au niveau de bactériocytes disséqués par rapport à celle dans l'ensemble du corps du pucerons. Cette approche leur a permis d'identifier les gènes les plus sur-exprimés dans les bactériocytes. Parmi ces gènes, ils ont découvert une nouvelle famille de 7 gènes, qu'ils ont nommée "Bacteriocyte-specific Cysteine-Rich" (BCR) : *BCR1, BCR2, BCR3, BCR4, BCR5, BCR6* et *BCR8*. L'analyse de leur expression par hybridation *in situ* à l'aide de sondes marquées à la digoxigénine a montré que ces gènes sont exprimés spécifiquement dans les bactériocytes, dès le stade embryonnaire 7 (Shigenobu & Stern, 2013), coïncidant avec l'incorporation de *Buchnera* dans les embryons au stade blastoderme (Braendle *et al.*, 2003) et continuent à y être exprimé jusqu'au stade de jeunes adultes (**Figure 21a-b**). Leur expression dans les adultes tardifs n'a pas été étudiée par Shigenobu & Stern (**Figure 21c**).

Avant cette étude, deux BCR (BCR4 et BCR5) n'étaient pas annotés, peut-être à cause de leur petite taille (201 à 232 pb respectivement), ils n'avaient pas été détectés au moment du séquençage du génome du puceron du pois (IAGC, 2010). Après le nouveau séquençage et l'annotation du génome en 2019, seuls 4 BCR (BCR4, 5, 6 et 8) ont été annotés et uniquement comme "non-coding RNA", suggérant qu'ils ne coderaient pas de protéines. Leur découverte a soulevé des interrogations sur leur rôle. Des homologues des BCR ont été identifiés chez trois autres espèces de pucerons (*Myzus persicae*, *Aphis gossypii* et *Toxoptera*

Thèse accessible à l'adresse : https://theses.insa-lyon.fr/publication/2025ISAL0089/these.pdf © [H. Terrasson], [2025], INSA Lyon, tous droits réservés

citricida), sans que leur fonction ne soit clairement élucidée (Shigenobu & Stern, 2013).

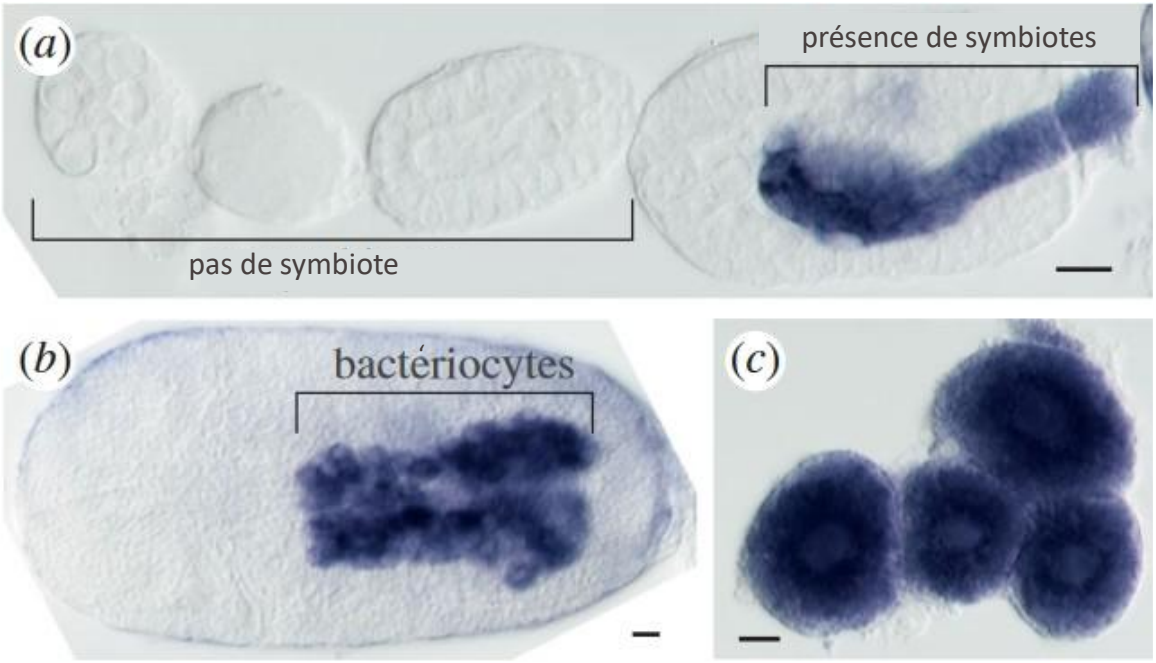


Figure 21 : Profil spatio-temporel d'expression des gènes BCR chez *A. pisum*. (a–c) Expression de **BCR4**, depuis les premières étapes de l'embryogenèse jusqu'au stade 7 (**a**, de gauche à droite), **(b)** dans les bactériocytes embryonnaires et **(c)** dans les bactériocytes adultes disséqués. Les auteurs montrent que les autres *BCR* partagent le même profil d'expression dans leur article. *D'après Shigenobu & Stern (2013).*

4.3.2 Caractéristique des BCR : des défensines ?

En plus de figurer parmi les gènes les plus surexprimés dans les bactériocytes, les sept peptides BCR présentent des caractéristiques structurales communes particulièrement intéressantes dans le contexte de la symbiose : (i) ce sont de petites protéines [67 à 108 acides aminés et de masses moléculaires comprises entre 7,78 et 12,93 kilos Dalton (kDa)] ; (ii) elles possèdent 6 ou 8 résidus cystéines, avec un espacement très conservé ; et (iii) elles présentent une séquence hydrophobe en N-terminal, identifiée comme un peptide signal du RE par l'algorithme de prédiction « SignalP » (dernière version : Teufel *et al.*, 2022) (**Figure 22**). La présence d'un peptide signal du RE indique que, après ou pendant leur traduction, ces protéines sont dirigées vers le RE, où le peptide signal est clivé pour produire une protéine mature, plus petite (5,3 à 10,02 kDa). Ces formes matures sont ensuite dirigées vers l'espace extracellulaire ou dans

Thèse accessible à l'adresse : https://theses.insa-lyon.fr/publication/2025ISAL0089/these.pdf © [H. Terrasson], [2025], INSA Lyon, tous droits réservés

des organites intracytoplasmiques (Vázquez-Martínez *et al.*, 2012 ; Shafee *et al.*, 2017 ; Owji *et al.*, 2018 ; Sørensen *et al.*, 2025).

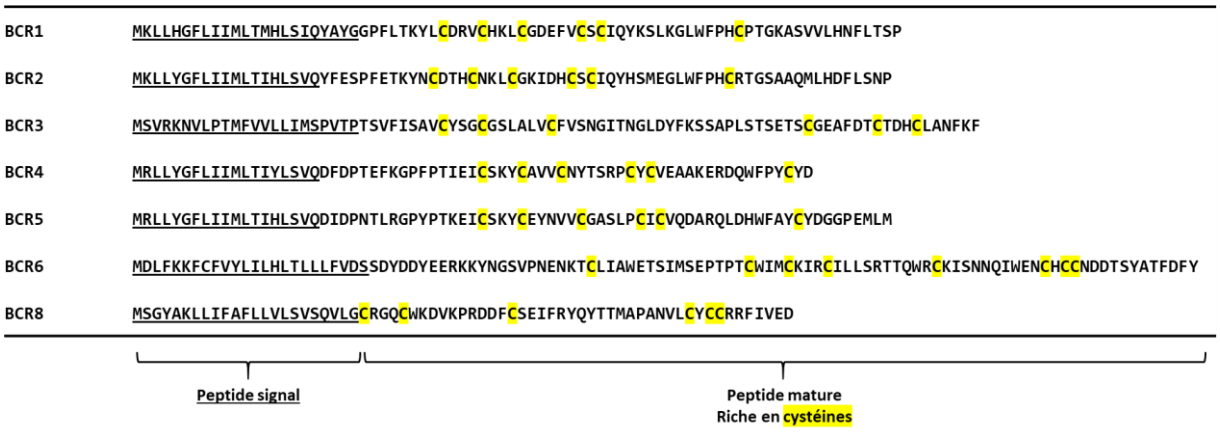


Figure 22 : Structures primaires des BCR du puceron du pois. La partie soulignée correspond au peptide signal prédit par l'algorythme SignalP. Les résidus cystéines sont surlignés en jaune.

Cette structure primaire rappelle celle des défensines, une famille bien étudiée d'AMP. Shafee *et al.* (2017) décrivent les défensines comme de « petites protéines (moins de 10 kDa), riches en cystéines, produites avec peptide signal du RE à l'extrémité N-terminale ». Les défensines sont omniprésentes chez les eucaryotes, dont les insectes (Diptères, Hyménoptères, Coléoptères, Lépidoptères, Hémiptères, Isoptères ou encore l'ancien ordre des Odonates) (Yi *et al.*, 2014). Elles assurent principalement une fonction immunitaire, en tant que molécules de défense humorale antimicrobienne (Kojour *et al.*, 2020). Par ailleurs, la structure primaire des BCR rappelle celle des CCR de *R. pedestris* et des NCR des légumineuses, dont le rôle dans le contrôle des symbiotes a été démontré (**cf Parties 3**).

Les BCR pourraient donc représenter les premiers AMP identifiés chez les pucerons. Cependant, la structure primaire ne suffit pas à classer une protéine comme défensine.

Tout d'abord, une défensine possède généralement une activité antimicrobienne. Uchi *et al.* (2019) ont évalué l'activité bactéricide des BCR1, 2, 3, 4, 5 et 8 contre les bactéries à Gram négatif *E. coli* et *Sinorhizobium meliloti*. A l'exception de BCR2, tous ont montré une forte activité antibactérienne *in vitro*. Une coloration à l'iodure de propidium (PI), qui pénètre uniquement les cellules ayant une membrane endommagée, a révélé une augmentation

Thèse accessible à l'adresse : https://theses.insa-lyon.fr/publication/2025ISAL0089/these.pdf © [H. Terrasson], [2025], INSA Lyon, tous droits réservés

significative du marquage PI dans les bactéries traitées par les BCR, suggérant un effet perméabilisant (Uchi *et al.*, 2019). Ce mode d'action rappelle celui de nombreuses défensines, qui se lient aux membranes bactériennes anioniques *via* des interactions électrostatiques, avant d'induire leur déstabilisation. Selon leur concentration et leur structure, elles peuvent soit s'insérer dans la bicouche pour former des pores transitoires (modèles « barrel-stave » ou « toroïdal »), soit s'accumuler à la surface jusqu'à provoquer une fragmentation de type « carpet », comparable à un effet détergent (**Figure 23** ; Shai, 2002 ; Brogden, 2005 ; Agadi *et al.*, 2022).

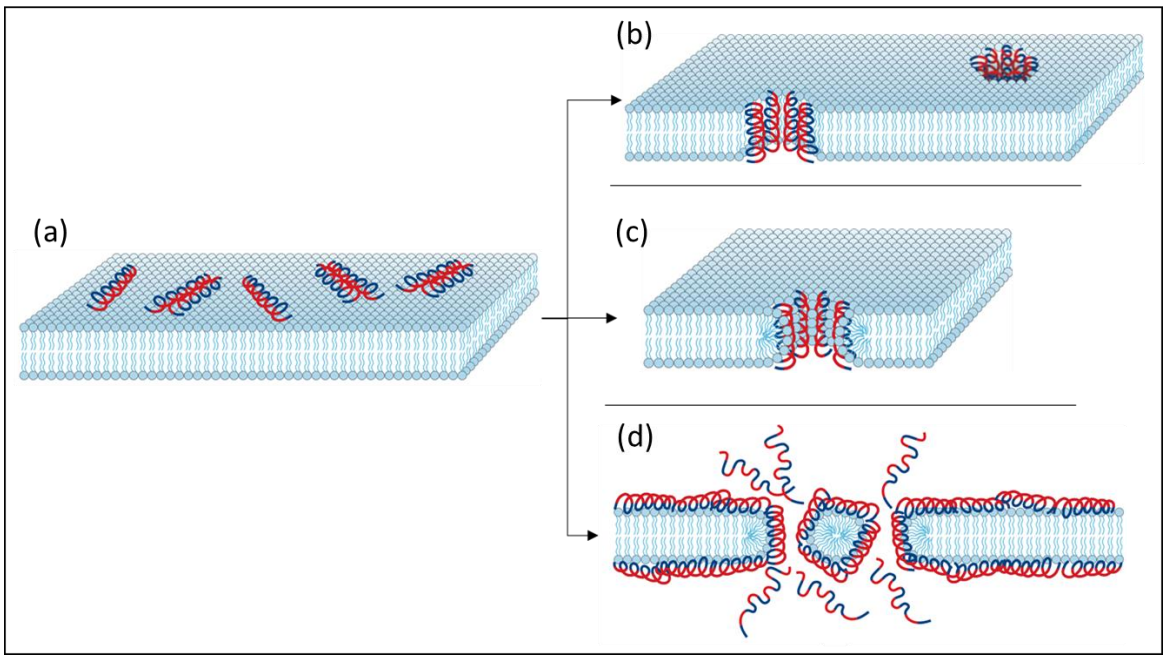


Figure 23 : Mécanismes d'action des peptides antimicrobiens sur les membranes bactériennes. **(a)** Après s'être accumulés à la surface de la membrane, les peptides antimicrobiens peuvent l'altérer selon trois modèles distincts : **(b)** dans le modèle « barrel-stave », ils s'insèrent perpendiculairement et forment un pore tapissé uniquement par les peptides ; **(c)** dans le modèle toroïdal, la membrane se courbe autour du pore, qui est bordé à la fois par les peptides et les têtes lipidiques qui composent la membrane ; **(d)** dans le modèle « carpet », l'accumulation massive de peptides entraîne une désintégration complète de la bicouche, sans formation de pore structuré. Les régions hydrophiles du peptide sont en rouge, les régions hydrophobes sont en bleu. *Adapté de Brogden (2005)*.

Ensuite, les défensines se caractérisent par des structures secondaires et tertiaires bien définies. Les cystéines jouent un rôle essentiel en formant des ponts disulfures, qui stabilisent la conformation tridimensionnelle de la protéine. Une fois ce repliement achevé, la protéine devient fonctionnelle (González-Castro *et al.*, 2021). Il existe deux grandes familles structurales de défensines, les *cis*-défensines et les *trans*-défensines (Shafee *et al.*, 2016). Il reste à déterminer à laquelle de ces deux familles appartiennent les BCR.

Thèse accessible à l'adresse : https://theses.insa-lyon.fr/publication/2025ISAL0089/these.pdf © [H. Terrasson], [2025], INSA Lyon, tous droits réservés

Les BCR, par leurs caractéristiques structurales et fonctionnelles proches des défensines, ainsi que leur expression spécifique aux bactériocytes, apparaissent comme d'excellents candidats pour jouer un rôle dans la régulation de la symbiose chez les pucerons.

Thèse accessible à l'adresse : https://theses.insa-lyon.fr/publication/2025ISAL0089/these.pdf © [H. Terrasson], [2025], INSA Lyon, tous droits réservés

OBJECTIFS DE LA THESE

La compréhension des mécanismes régulant la symbiose chez les insectes n'en est encore qu'à ses débuts. Comme évoqué dans l'introduction de ce manuscrit, des études récentes suggèrent un rôle important du système immunitaire dans cette régulation. La découverte des peptides BCR chez *A. pisum*, par Shigenobu & Stern (2013) a remis en question l'idée selon laquelle les pucerons seraient dépourvus d'AMP. Depuis cette découverte, très peu d'études ont été menées pour élucider les fonctions des BCR. Pourtant, leur expression strictement bactériocytaire, associée à leurs caractéristiques typiques des défensines, en fait d'excellents candidats pour exercer des fonctions de régulateurs de la symbiose chez les pucerons.

Mon projet de thèse avait donc pour objectif de mieux comprendre le rôle des BCR chez le puceron. Dans un premier temps, nous avons cherché à retracer l'histoire évolutives de cette nouvelle famille de peptide. Les récents progrès en matière de séquençage et d'annotations de génomes d'insectes nous ont permis de rechercher des homologues des BCR du puceron du pois dans d'autres espèces et de reconstituer leur phylogénie. Nous nous sommes ensuite focalisés sur l'un des membres de cette famille, BCR4, dont nous avons reconstitué la structure tridimensionnelle. La synthèse chimique de BCR4, nous a également permis de réaliser des tests fonctionnels pour explorer l'effet de BCR4 sur des bactéries à Gram positif et à Gram négatif et d'explorer son potentiel entomotoxique. Ces résultats sont présentés dans le **Chapitre 1** de ce manuscrit.

Dans l'objectif de mieux comprendre les effets de l'ingestion de BCR4 sur *A. pisum* et d'évaluer son potentiel en tant que biopesticide, nous avons mené une étude comparative sur trois lignées de *A. pisum*. Deux d'entre elles, LL01 et YR2amp sont mono-symbiotiques, porteuse uniquement du symbiote obligatoire *B. aphidicola*, mais présentent des fonds génétiques différents. La troisième lignée, YR2-*Ri,* est di-symbiotique et héberge également le symbiote secondaire *Regiella insecticola*, tout en partageant le même fond génétique que YR2amp. L'objectif était de comparer les effets de l'ingestion de BCR4 en fonction du statut symbiotique et du fond génétique des individus, deux facteurs pouvant

Thèse accessible à l'adresse : https://theses.insa-lyon.fr/publication/2025ISAL0089/these.pdf © [H. Terrasson], [2025], INSA Lyon, tous droits réservés

faire varier la réponse des pucerons face à différents stress. L'impact de BCR4 sur la survie, le développement embryonnaire et le nombre et la localisation des symbiotes dans ces trois lignées a été analysé, et les résultats obtenus sont présentés dans le **Chapitre 2** de ce manuscrit.

Enfin, afin de mieux comprendre le rôle de BCR4, nous avons étudié sa localisation subcellulaire au sein des bactériocyte. A l'aide d'anticorps dirigés contre ce peptide, produits au cours de ma thèse, j'ai pu démontrer pour la première fois la présence de la forme traduite de BCR4 dans les bactériocytes du puceron du pois. J'ai également analysé l'évolution de cette localisation au cours du développement et par rapport à d'autres composants cellulaires. Ces résultats sont développés dans le **Chapitre 3** de ce manuscrit.

Thèse accessible à l'adresse : https://theses.insa-lyon.fr/publication/2025ISAL0089/these.pdf © [H. Terrasson], [2025], INSA Lyon, tous droits réservés

CHAPITRE 1
LES BCR CONSTITUENT UNE NOUVELLE FAMILLE DE DEFENSINES A ACTIVITE ENTOMOTOXIQUE : FOCUS SUR BCR4

Une première étude menée par Shigenobu & Stern, (2013) a permis de découvrir les BCR, une nouvelle famille de peptides chez le puceron du pois, *Acyrthosiphon pisum*. Uchi *et al.* (2019) ont ensuite synthétisé chimiquement ces BCR (à l'exception de BCR6), ce qui leur a permis d'évaluer leur activité antimicrobienne *in vitro*. Comme décrit dans la partie 4.3 de l'introduction, ces deux études ont montré que : (i) les BCR sont des peptides similaires aux peptides antimicrobiens (AMP) de type défensine, (ii) ils sont exprimés spécifiquement dans les bactériocytes du puceron du pois, dès les stades embryonnaires précoces, de manière concomitante à l'infection par le symbiote obligatoire *Buchnera aphidicola*, et (iii) ils possèdent une activité antibactérienne, en perméabilisant la membrane de la bactérie libre *Escherichia coli*.

Avant le début de ma thèse, ces deux études constituaient les seules recherches menées sur les BCR. De nombreuses questions restaient donc à élucider. Nous avons décidé d'approfondir l'étude de cette famille de peptides, en utilisant des approches multidisciplinaires et complémentaires.

La première étape a consisté en une analyse génomique comparative, complétée par une étude phylogénétique des BCR. En effet, lors de la publication de l'article de Shigenobu & Stern (2013), le séquençage et l'annotation des génomes eucaryotes n'en étaient qu'à leurs débuts, et peu de génomes d'arthropodes étaient alors accessibles publiquement. Selon les données disponibles dans NCBI, seuls 345 génomes références eucaryotes (dont 26 d'arthropodes) étaient disponibles en 2013, contre 8 377 (dont 1 813 d'arthropodes) en 2022 (https://www.ncbi.nlm.nih.gov/datasets/genome/).

À partir de données génétiques partielles (EST, « *Expressed Sequence Tags* »), Shigenobu & Stern (2013) avaient néanmoins identifié des homologues de BCR3 et BCR8 chez le puceron vert du pêcher *Myzus persicae* et le puceron du melon *Aphis gossypii*, ainsi qu'un homologue de BCR3 chez le puceron brun des agrumes *Toxoptera citricida*. Ces résultats suggéraient que les BCR n'étaient

Thèse accessible à l'adresse : https://theses.insa-lyon.fr/publication/2025ISAL0089/these.pdf © [H. Terrasson], [2025], INSA Lyon, tous droits réservés

pas exclusifs à *A. pisum*. Les auteurs allaient même jusqu'à qualifier les BCR de « gènes orphelins », qui ne seraient présents que chez les pucerons. Toutefois, le manque de génomes représentatifs d'autres ordres d'insectes ne permettait pas d'appuyer solidement cette conclusion. Il était donc indispensable de réévaluer ces analyses à partir des données génomiques actuelles.

Cette nouvelle analyse a permis d'identifier 76 nouvelles séquences homologues aux BCR d'*A. pisum*, réparties chez 20 espèces, toutes appartenant à la super-famille des Aphidoidea. En plus de confirmer le caractère « puceron-spécifique » des BCR, nous avons reconstruit leur arbre phylogénétique, ce qui nous a permis de distinguer quatre sous-familles, différenciées par le nombre et l'espacement des résidus cystéines. Ces sous-familles ont été nommées d'après les BCR de *A. pisum* : « BCR1-2-4-5-like », « BCR3-like », « BCR6-like » et « BCR8-like » (Figure 4 de l'article Loth *et al.*, 2022). Toutes ces sous-familles ne sont pas présentes chez tous les pucerons, et cette diversification structurale et phylogénétique pourrait refléter une diversification fonctionnelle.

Dans un deuxième temps, en collaboration avec le Centre de Biophysique Moléculaire d'Orléans, nous avons synthétisé et replié BCR4, l'un des BCR les plus courts de *A. pisum.* Cela nous a permis de résoudre sa structure tridimensionnelle par résonance magnétique nucléaire. Cette technique permet d'identifier les structures secondaires (hélices α et feuillets β), ainsi que les ponts disulfures au sein de la protéine. L'analyse comparative de la structure 3D de BCR4 avec celles d'autres défensines a révélé que BCR4 constitue, à ce jour, l'unique représentant d'une toute nouvelle famille structurale de défensines (Figure 7 de l'article Loth *et al.*, 2022).

Une fois la structure de BCR4 déterminée, nous avons utilisé ce peptide synthétique pour mener des études fonctionnelles. Nous avons ainsi confirmé les résultats de Uchi *et al.* (2019) en démontrant que BCR4 possède une activité bactéricide contre *E. coli*, une bactérie à Gram négatif. En revanche, aucune activité n'a été observée contre *Micrococcus luteus*, une bactérie à Gram positif. Ces résultats suggèrent que BCR4 est actif uniquement contre les bactéries à Gram négatif, le groupe de bactéries auquel appartiennent les symbiotes obligatoires et secondaires des pucerons.

Des travaux antérieurs du laboratoire ont montré que les petites protéines riches en ponts disulfure, issues de plantes ou d'arthropodes, ont des propriétés

Thèse accessible à l'adresse : https://theses.insa-lyon.fr/publication/2025ISAL0089/these.pdf © [H. Terrasson], [2025], INSA Lyon, tous droits réservés

entomotoxiques et représentent des candidats prometteurs comme biopesticides alternatifs vis-à-vis des insectes (Rahioui *et al.*, 2014). Une étude d'ingestion de BCR4 par des pucerons *A. pisum* de la lignée LL01, qui est une lignée monosymbiotique, ne contenant que le symbiote obligatoire *B. aphidicola*, a donc été réalisée. Elle a montré que ce peptide exerce bien une activité insecticide sur cette espèce, même si les causes exactes de cet effet restent à déterminer (Figure 3 de l'article Loth *et al.*, 2022.

Ces résultats confirment que les BCR sont bien spécifiques aux pucerons, ont des caractéristiques structurales de défensines. Parmi eux, BCR4 à une structure unique, une toxicité spécifique aux bactéries à Gram négatif et pourrait potentiellement être utilisé en tant que biopesticide. Ces résultats ont été publiés en 2022 dans la revue *International Journal of Molecular Sciences*. Ils seront discutés en détail dans la section **Discussion générale** de ce manuscrit.

Thèse accessible à l'adresse : https://theses.insa-lyon.fr/publication/2025ISAL0089/these.pdf © [H. Terrasson], [2025], INSA Lyon, tous droits réservés

Article 1 : Aphid BCR4 Structure and Activity Uncover a New Defensin Peptide Superfamily

Article publié dans la revue International Journal of Molecular Sciences :

Loth, K., Parisot, N., Paquet, F., Terrasson, H., Sivignon, C., Rahioui, I., Ribeiro Lopes, M., Gaget, K., Duport, G., Delmas, A. F., Aucagne, V., Heddi, A., Calevro, F., & da Silva, P. (2022). **Aphid BCR4 structure and activity uncover a new defensin peptide superfamily.** *International Journal of Molecular Sciences*, *23*(20), Article 20. https://doi.org/10.3390/ijms232012480

Thèse accessible à l'adresse : https://theses.insa-lyon.fr/publication/2025ISAL0089/these.pdf © [H. Terrasson], [2025], INSA Lyon, tous droits réservés

International Journal of
Molecular Sciences

MDPI

Article

Aphid BCR4 Structure and Activity Uncover a New Defensin Peptide Superfamily

Karine Loth [1,2,†], Nicolas Parisot [3,†], Françoise Paquet [1], Hugo Terrasson [3], Catherine Sivignon [4], Isabelle Rahioui [4], Mélanie Ribeiro Lopes [3], Karen Gaget [4], Gabrielle Duport [4], Agnès F. Delmas [1], Vincent Aucagne [1], Abdelaziz Heddi [3], Federica Calevro [4] and Pedro da Silva [3,*]

1 Centre de Biophysique Moléculaire, CNRS UPR 4301, 45071 Orléans, France
2 UFR Sciences et Techniques, Université d'Orléans, 45071 Orléans, France
3 Univ Lyon, INSA Lyon, INRAE, BF2I, UMR 203, 69621 Villeurbanne, France
4 Univ Lyon, INRAE, INSA Lyon, BF2I, UMR 203, 69621 Villeurbanne, France
* Correspondence: pedro.da-silva@insa-lyon.fr
† These authors contributed equally to this work.

Abstract: Aphids (Hemiptera: Aphidoidea) are among the most detrimental insects for agricultural plants, and their management is a great challenge in agronomical research. A new class of proteins, called Bacteriocyte-specific Cysteine-Rich (BCR) peptides, provides an alternative to chemical insecticides for pest control. BCRs were initially identified in the pea aphid *Acyrthosiphon pisum*. They are small disulfide bond-rich proteins expressed exclusively in aphid bacteriocytes, the insect cells that host intracellular symbiotic bacteria. Here, we show that one of the *A. pisum* BCRs, BCR4, displays prominent insecticidal activity against the pea aphid, impairing insect survival and nymphal growth, providing evidence for its potential use as a new biopesticide. Our comparative genomics and phylogenetic analyses indicate that BCRs are restricted to the aphid lineage. The 3D structure of BCR4 reveals that this peptide belongs to an as-yet-unknown structural class of peptides and defines a new superfamily of defensins.

Keywords: aphid BCR; 3D structure; defensin peptide; bioinsecticidal peptide; symbiosis

check for updates

Citation: Loth, K.; Parisot, N.; Paquet, F.; Terrasson, H.; Sivignon, C.; Rahioui, I.; Ribeiro Lopes, M.; Gaget, K.; Duport, G.; Delmas, A.F.; et al. Aphid BCR4 Structure and Activity Uncover a New Defensin Peptide Superfamily. *Int. J. Mol. Sci.* **2022**, *23*, 12480. https://doi.org/10.3390/ijms232012480

Academic Editor: T. G. Emyr Davies

Received: 22 September 2022
Accepted: 12 October 2022
Published: 18 October 2022

Publisher's Note: MDPI stays neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.

Copyright: © 2022 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/).

1. Introduction

Insects are among the most important pests of cultured plants and stored products, causing an estimated yearly loss of hundreds of millions of dollars worldwide [1–3]. Aphids, in particular, hold a prominent place among insect pests, as they represent up to 26% of the pests found on the main food crops (maize, wheat, potatoes, sugar beet, barley and tomatoes) grown in temperate climates [4,5]. Aphid control strategies rely almost exclusively on chemical treatments, which cause persistent environmental pollution and lead to the emergence of insect resistance [6]. New ecologically friendly solutions are therefore required to control aphids and other phloem-feeders.

Small Disulfide bond-Rich Proteins (DRPs) extracted from plants or arthropods are promising alternative biopesticide molecules [7–9]. These naturally occurring molecules display a very broad range of biological activities, mainly related to host-defense processes [10], and show a high structural and chemical diversity. Their exceptional stability is particularly appealing for drug discovery purposes [11]. The rather rigid three-dimensional conformations imposed by their polycyclic architecture confer DRPs with a strong resistance towards in vivo enzymatic degradation. Taken together, these features contribute to establishing DRPs as an emerging lead compound for the development of novel peptide-based drugs and, more recently, as potential biopesticides in agronomical research [7,8,12,13]. For instance, a knottin DRP extracted from pea seeds, PA1b (Pea Albumin 1, subunit b, 37 amino acids (aa), three disulfide bonds) [9,12,14], is toxic to numerous insects, including aphids, cereal weevils, mosquitos and moths [12].

Thèse accessible à l'adresse : https://theses.insa-lyon.fr/publication/2025ISAL0089/these.pdf © [H. Terrasson], [2025], INSA Lyon, tous droits réservés

A new class of DRP, called Bacteriocyte-specific Cysteine-Rich (BCR) peptides, has recently been identified in a major crop pest, the pea aphid, *Acyrthosiphon pisum* [15]. Similar to many other crop pest insects that thrive on unbalanced diets, aphids have evolved long-lasting relationships with endosymbiotic bacteria, and almost all aphids are found in association with the γ3-proteobacterium *Buchnera aphidicola* [16–18]. This bacterium supplements the host diet with nutrients that are lacking or limited in their habitats, thereby allowing insects to proliferate, causing major economic, social, and health damage. Neither the host nor the endosymbionts can survive independently. *B. aphidicola* is non-culturable, and insects artificially deprived of their endosymbionts (aposymbiotic) cannot survive or reproduce [19]. The maintenance of this association relies on the compartmentalization of endosymbionts in specialized insect cells, called bacteriocytes [20]. BCRs are encoded by seven orphan genes, and are all expressed exclusively in bacteriocytes of both embryonic and adult aphids [15]. This suggests that BCRs may play a role in bacteriocyte homeostasis, presumably in endosymbiont control, as previously described for antimicrobial peptide coleoptericin A in the cereal–weevil endosymbiosis [21]. Consistent with this hypothesis, it has been shown that BCR1, BCR2, BCR3, BCR4, BCR5 and BCR8 exhibit antimicrobial activity or can permeabilize the membrane of *E. coli* cells [22].

Each BCR peptide consists of a secretory signal peptide and a mature peptide (Figure 1) composed of 44–84 amino acids and containing from six cysteine residues in the case of BCR1-2-4-5 and BCR8 to eight in the case of BCR6 [15]. Between BCR1, BCR2, BCR4 and BCR5, the cysteine-rich region is highly divergent, but the six cysteines have almost identical spacing in the predicted proteins. Three of these peptides, BCR1, BCR4 and BCR5, are encoded by genes found within a genomic region of 20 kbp, suggesting that they may have arisen due to a recent tandem gene duplication. No similarity was found between the other BCR family genes [15]. Intriguingly, the pea aphid BCRs show no significant sequence similarity with genes in species outside the aphid lineage.

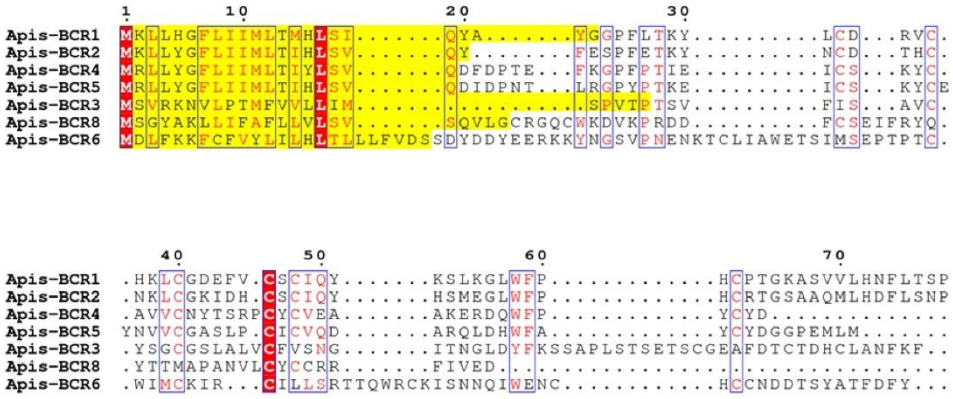


Figure 1. Multiple sequence alignment of *Acyrthosiphon pisum* BCRs. The number and the spacing between these cysteine residues allow to distinguish four BCR sub-families: BCR1-2-4-5, BCR3, BCR8 (containing all six cysteines) and BCR6 (eight cysteines). The signal peptides predicted by SignalP 6.0 server [23] of BCR sequences are highlighted in yellow. The fully conserved residues are framed and highlighted in red.

DRPs have undergone extensive divergent evolution in their sequence structure and function. They are classified based on their secondary structure orientation, cysteine distribution across the sequence, structure similarities in the disulfide bond patterns and precursor gene sequence [10,24]. Based on the sequence analysis, it was assumed that they could have evolved from defensin-type antimicrobial peptides (AMPs), small proteins containing six to eight cysteines, which are universally found in both animals and plants [15,22].

Thèse accessible à l'adresse : https://theses.insa-lyon.fr/publication/2025ISAL0089/these.pdf © [H. Terrasson], [2025], INSA Lyon, tous droits réservés

In this study, we focused on BCR4 of *A. pisum*, a benchmark example of a peptide with antimicrobial activities [22]. We discovered that BCR4 has strong insecticidal activity against the pea aphid. Taking advantage of the recent sequencing of several aphid genomes, which enables the study of gene family diversification through comparative and evolutionary analyses [25,26], we conducted a comparative genomic analysis across 22 aphid species for which sequence information was available. This allowed the identification of 76 new BCR sequences, all restricted to aphid species and not related to any known defensins. Finally, we determined the 3D structure of BCR4 and showed that it belongs to a new structural class of disulfide-rich proteins. Overall, the biochemical analyses, the evolutionary history, and the 3D structure of BCR4 give significant insight into the biological and structural properties of BCRs, and provide evidence for the use of this new defensin superfamily as potential new biopesticides.

2. Results

2.1. Total Synthesis of BCR4

To investigate the biological activity of members of the BCR peptide family and to resolve their 3D structure by NMR, a pure sample of synthetic BCR4 was produced through total chemical synthesis. As standard automated Fmoc/tBu solid-phase peptide synthesis (SPPS) was unsuccessful (Supplementary Materials Figures S1 and S2, Table S1), we turned to a native chemical ligation (NCL)-based approach [27], relying on the assembly of two medium-sized peptide segments. Using a recently developed methodology [28–33], we coupled a 20-amino-acid (aa) N-2-hydroxy-5-nitrobenzylcysteine (N-Hnb-Cys) crypto-thioester with a 30-aa cysteinyl peptide and obtained the full-length reduced form of BCR4 at high purity (Figure 2). Oxidative folding under thermodynamic control was achieved using a standard protocol [34,35], leading to one major compound featuring three disulfide bridges as evidenced by HRMS analysis (Supplementary Materials Figures S3–S11).

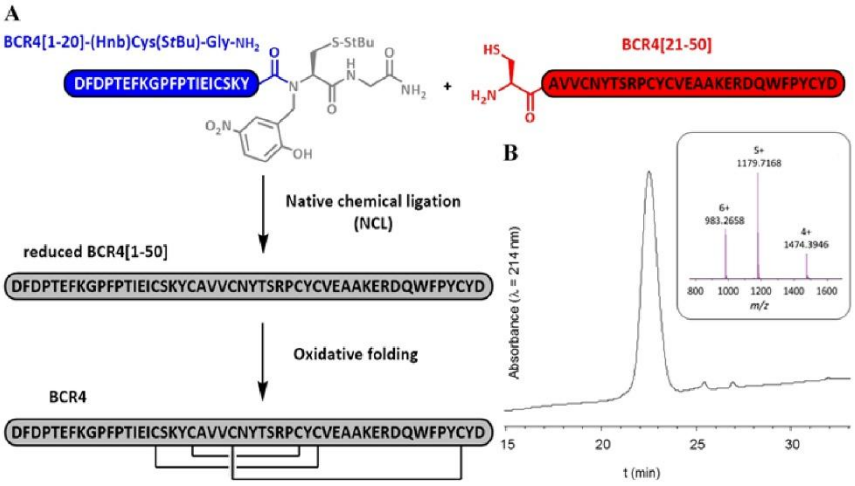


Figure 2. Chemical synthesis of BCR4. (**A**) Schematic representation of the BCR4 peptide chemical through native chemical ligation (NCL) of two peptide segments BCR4[1-20] in blue and BCR4[21-50] in red, followed by oxidative folding to form the three disulfide bridges. (**B**) RP-HPLC chromatogram and ESI-HRMS mass spectrum of the purified folded peptide.

2.2. Antimicrobial Activities of BCR4

To assess the antimicrobial activity of BCR4, we tested the effect of various concentrations (ranging from 5 μM to 80 μM) of this peptide on the growth of the Gram-negative bacterium *Escherichia coli* (strain NM522) and the Gram-positive bacterium *Micrococcus*

Thèse accessible à l'adresse : https://theses.insa-lyon.fr/publication/2025ISAL0089/these.pdf © [H. Terrasson], [2025], INSA Lyon, tous droits réservés

luteus. Consistent with previous observations [22], a slight inhibition of *E. coli* growth was detected at 5 µM BCR4. This antimicrobial activity increased with BCR4 concentration, and we determined a minimal inhibitory concentration (MIC) of 17.0 ± 2.4 µM, for which no bacterial growth was detected. Comparatively, no antimicrobial activity was detected against the Gram-positive bacterium *Micrococcus luteus* (Table 1).

Table 1. Antimicrobial activities of BCR4 peptide.

	MIC [a] (µM)
Escherichia coli NM522	17.0 ± 2.4
Micrococcus luteus	>80

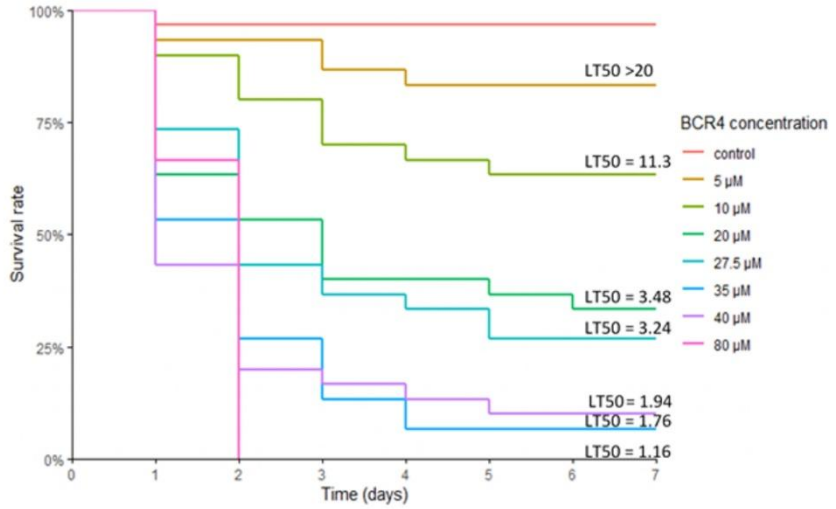
[a] Minimal inhibitory concentration.

2.3. Insect Bioassays

The insecticidal potential of BCR4 was assayed by oral administration of various concentrations of this peptide to the pea aphid and monitoring of survival. For all BCR4 concentrations tested (5–80 µM), aphid mortality was always significantly higher in the BCR4 aphids compared to the control group, demonstrating a specific effect of BCR4 ingestion on aphid survival (Figure 3). This effect was dependent on BCR4 dosage and duration of treatment. The highest concentration tested (80 µM) also had the strongest lethal effect, with a Lethal Time 50% (LT50) of 1.16 days (Table 2) and no surviving aphids after two days of BCR4 treatment (Figure 3).

Table 2. Toxicity of BCR4 peptide on the pea aphid *Acyrthosiphon pisum* (mean values of Lethal Time 50 (LT50) in days, with confidence intervals), analyzed by survival analysis with a log-normal fit.

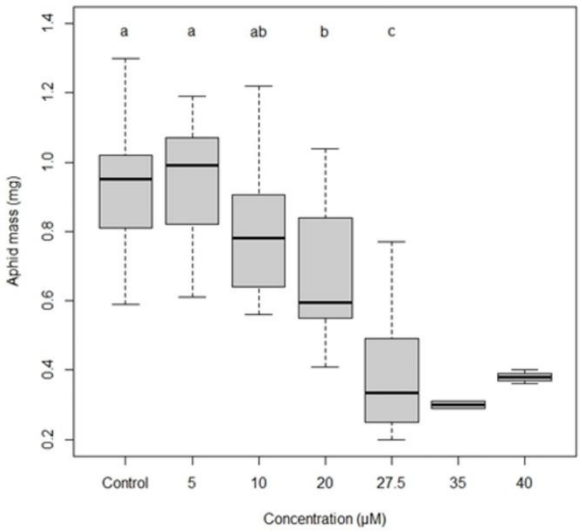
	Concentration (µM)						
BCR4 peptide	80	40	35	27.5	20	10	5
LT50 (days)	1.16 [0.98–1.37]	1.76 [1.27–2.42]	1.94 [1.47–2.57]	3.24 [2.22–4.72]	3.48 [2.28–5.31]	11.3 [4.16–30.8]	>20



(A)

Figure 3. *Cont.*

Thèse accessible à l'adresse : https://theses.insa-lyon.fr/publication/2025ISAL0089/these.pdf © [H. Terrasson], [2025], INSA Lyon, tous droits réservés



(**B**)

Figure 3. (**A**) Survival curves of the aphid *Acyrthosiphon pisum* reared on artificial diets containing different concentrations of BCR4 peptide. Mean values of Lethal Time 50 (LT50), in days, are indicated above each curve. (**B**) Mass (mg) of 7-day-old pea aphid *Acyrthosiphon pisum* subjected to BCR4 treatment. Concentrations labeled with different letters are significantly different ($p < 0.05$). The surviving aphid sample sizes of BCR4 at 35 and 40 µM were too small to be statistically meaningful.

Even for concentrations as low as 20 µM, aphids, on average, did not survive more than 4 days, and only one-third reached adulthood. Apart from this effect on aphid survival, the most striking phenotypical effect observed with BCR4 treatment was a statistically significant growth inhibition of the surviving aphids for doses higher than 5 µM, with, for instance, a 60% weight reduction 7 days after ingestion of BCR4 at 27.5 µM (Figure 3B).

2.4. Phylogeny of the BCR Family

To decipher the molecular evolution of the BCR peptides, we aimed to identify the whole set of proteins homologous to the seven *A. pisum* BCR proteins. Through an exhaustive search of the NCBI nucleotide and protein databases, coupled with specific inspection of the sequenced aphid species available in the AphidBase database [36], we retrieved a total of 76 new BCR sequences across 20 aphid species (Table S2) of the 22 for which sequences are available in publicly available databases. We also found one additional sequence from *A. pisum*, bringing the total number of BCRs in this insect to eight. Interestingly, all these sequences have been found in members of the Aphidoidea super-family, thus confirming that BCR proteins are restricted to the aphid lineage [15]. The complete set of 83 BCR sequences was used for amino acid sequence alignment and phylogenetic tree reconstruction (Figure 4). Based on these, the BCR sequences can be grouped into four subfamilies, including homologs of the BCR1-2-4-5, BCR3, BCR6 and BCR8 sequences of *A. pisum*, respectively. The majority of subfamilies have six cysteine residues except for the BCR6 subfamily, which has eight cysteines. The spacing between cysteines within the BCR sequences is fully conserved within subfamilies, thus supporting within-family homologies and phylogenetic positioning (Table 3).

Thèse accessible à l'adresse : https://theses.insa-lyon.fr/publication/2025ISAL0089/these.pdf © [H. Terrasson], [2025], INSA Lyon, tous droits réservés

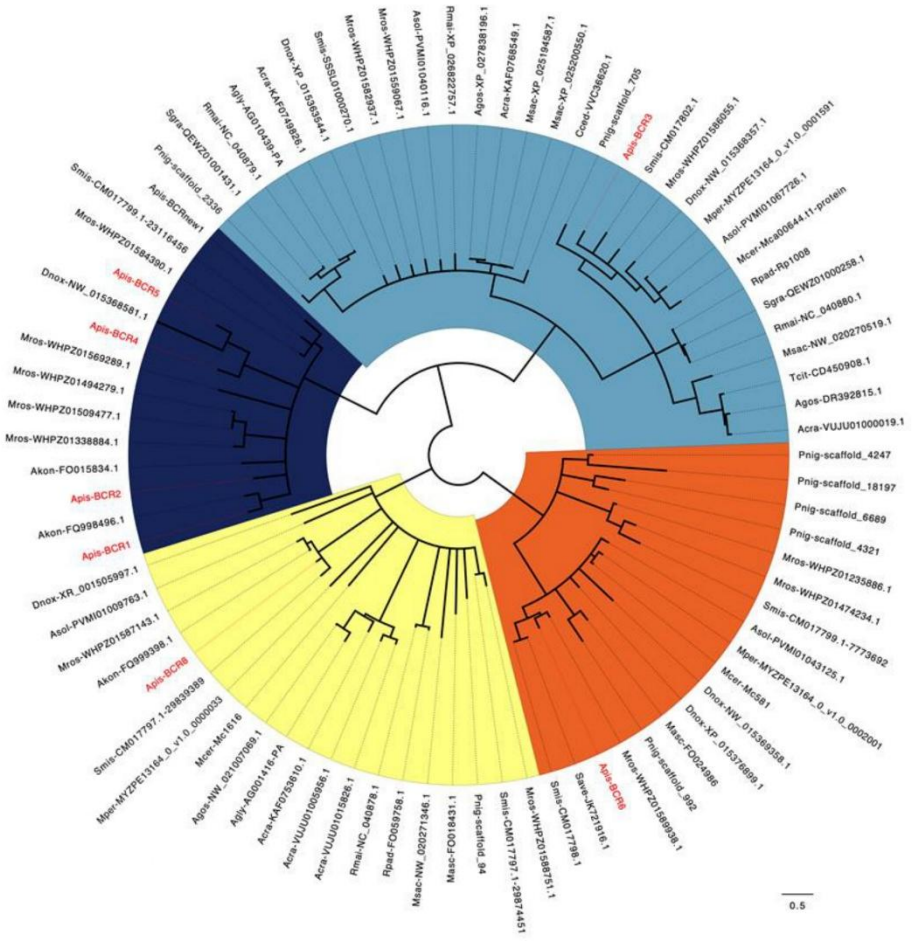


Figure 4. Phylogenetic trees of BCR proteins. Maximum likelihood phylogenetic tree reconstruction was performed using PhyML [37] with an LG 4-rate class model. Branch-support values were calculated using the bootstrap method, with 1000 replicates. Poorly supported branches (<50%) were collapsed using TreeCollapseCL4 [38]. The sequences used for the phylogenetic analysis are listed in Supplementary Materials Table S2. Sequences labeled in red reflect those identified by the Shigenobu and Stern [15] study in the pea aphid (*A. pisum* genome V3.0). Abbreviations: Acra, *Aphis craccivora*; Agly, *Aphis glycines*; Agos, *Aphis gossypii*; Akon, *Acyrthosiphon kondoi*; Apis, *Acyrthosiphon pisum*; Cced, *Cinara cedri*; Dnox, *Diuraphis noxia*; Dvit. *Daktulosphaira vitifoliae*; Masc, *Myzus ascalonicus*; Mcer, *Myzus cerasi*; Mper, *Myzus persicae*; Msac, *Melanaphis sacchari*; Rmai, *Rhopalosiphum maidis*; Rpad, *Rhopalosiphum padi*; Save, *Sitobion avenae*; Sgra, *Schizaphis graminum*; Tcit, *Toxoptera citricida*.

Thèse accessible à l'adresse : https://theses.insa-lyon.fr/publication/2025ISAL0089/these.pdf © [H. Terrasson], [2025], INSA Lyon, tous droits réservés

Table 3. Characteristics of the four BCR subfamilies and of the defensin families.

	Number of Cysteines	Consensus Motif	Cysteine Bonding Pattern	Number of Orthologous Sequences in Aphid Species [a]
BCR1-2-4-5	6	$CX_3CX_{3-5}CX_{4-6}CXCX_{11-13}C$	1:5, 2:4, 3:6	Akon (2), Apis (5), Mros (4), Smis (1), Mros (1), Dnox (1)
BCR3	6	$CX_3CX_6CX_{21-25}CX_6CX_3C$	Unknown	Acra (3), Agly (1), Agos (2), Apis (1), Asol (2), Cced (1), Dnox (2), Mcer (1), Mper (1), Mros (3), Msac (3), Pnig (2), Rma (3), Rpad (1), Sgra (2), Smis (2), Tcit (1)
BCR6	8	$CX_{15}CX_3CX_3CX_{10}CX_{10}CXCC$	Unknown	Apis (1), Asol (1), Dnox (2), Masc (1), Mcer (1), Mper (1), Mros (3), Pnig (5), Save (1), Smis (2)
BCR8	6	$CX_{3-4}CX_{10}CX_{15-17}CXCC$	Unknown	Akon (1), Acra (3), Agly (1), Agos (1), Apis (1), Asol (1), Dnox (1), Masc (1), Mcer (1), Mper (1), Msac (1), Mros (2), Pnig (1), Rmai (1), Rpad (1), Smis (2)
CSαβ	6 8	$CX_{6-15}CX_3CX_{9-10}CX_{4-7}CXC$ $CX_{10}CX_5CX_3CX_{9-10}CX_{6-8}CXCX_3C$	1:4, 2:5, 3:6 1:8, 2:5, 3:6, 4:7	insects plants
α-defensin	6	$CXCX_{3-5}CX_9CX_{6-10}CC$	1:6, 2:4, 3:5	primates
β-defensin	6	$CX_{5-7}CX_{3-5}CX_{8-11}CX_{4-6}CC$	1:5, 2:4, 3:6	vertebrates

[a] Abbreviations: Acra, *Aphis craccivora*; Agly, *Aphis glycines*; Agos, *Aphis gossypii*; Apis, *Acyrthosiphon pisum*; Asol, *Aulacorthum solani*; Cced, *Cinara cedri*; Dnox, *Diuraphis noxia*; Mcer, *Myzus cerasi*; Mper, *Myzus persicae*; Msac, *Melanaphis sacchari*; Mros, *Macrosiphum rosae*; Pnig, *Pentalonia nigronervosa*; Rmai, *Rhopalosiphum maidis*; Rpad, *Rhopalosiphum padi*; Save, *Sitobion avenae*; Sgra, *Schizaphis graminum*; Smis, *Sitobion miscanthi*; Tcit, *Toxoptera citricida*. No BCRs were found in *Eriosoma lanigerum* and *Sipha flava*.

Nineteen aphid species have full genome sequences available (*Acyrthosiphon pisum, Aphis craccivora, Aphis glycines, Aphis gossypii, Aulacorthum solani, Cinara cedri, Diuraphis noxia, Eriosoma lanigerum, Macrosiphum rosae, Melanaphis sacchari, Myzus cerasi, Myzus persicae, Pentalonia nigronervosa, Rhopalosiphum maidis, Rhopalosiphum padi, Schizaphis graminum, Sipha flava, Sitobion avenae, Sitobion miscanthi*). This makes it possible to predict the complete set of BCR peptides encoded by those aphid genomes. In this group, we observed a high variability in the number and distribution of BCR peptides among the four subfamilies (Table 3). No BCRs were found in the *E. lanigerum* (Eriosomatinae subfamily) and *S. flava* (Chaitophorinae subfamily) genomes, and only one in *C. cedri* (Lachninae subfamily) (Figure 5). All members of the Aphidinae subfamily appear to have at least two BCR genes, and *M. rosae* has the largest repertoire of BCR sequences, with 13 distinct sequences distributed across the four BCR subfamilies. While members of the BCR3 and BCR8 subfamilies are present in all Aphidinae species included in this study, members of the BCR1-2-4-5 and BCR6 subfamilies appear restricted to the Macrosiphini aphid tribe, suggesting that the genes encoding those BCRs arose from duplication of the former.

2.5. BCR4 Solution Structure

We next determined the 3D structure of BCR4 by NMR spectroscopy. The ^{1}H NMR and the natural-abundance ^{1}H-^{15}N sofast-HMQC spectra [39] of the protein showed a good dispersion of the amide chemical shifts, which is indicative of highly structured peptides. Following standard procedures, the analysis of the set of 2D-TOCSY and NOESY spectra allowed a complete assignment of ^{1}H chemical shifts. This assignment was facilitated by heteronuclear ^{1}H-^{15}N and ^{1}H-^{13}C NMR spectra, particularly in crowded regions of the ^{1}H TOCSY and NOESY spectra corresponding to side chains (BRMB entry 34197). The 3D structures were calculated by considering a total of 923 distance restraints, 16 hydrogen bonds, 88 dihedral angles, and three ambiguous disulfide bridges (Table 4).

Thèse accessible à l'adresse : https://theses.insa-lyon.fr/publication/2025ISAL0089/these.pdf © [H. Terrasson], [2025], INSA Lyon, tous droits réservés

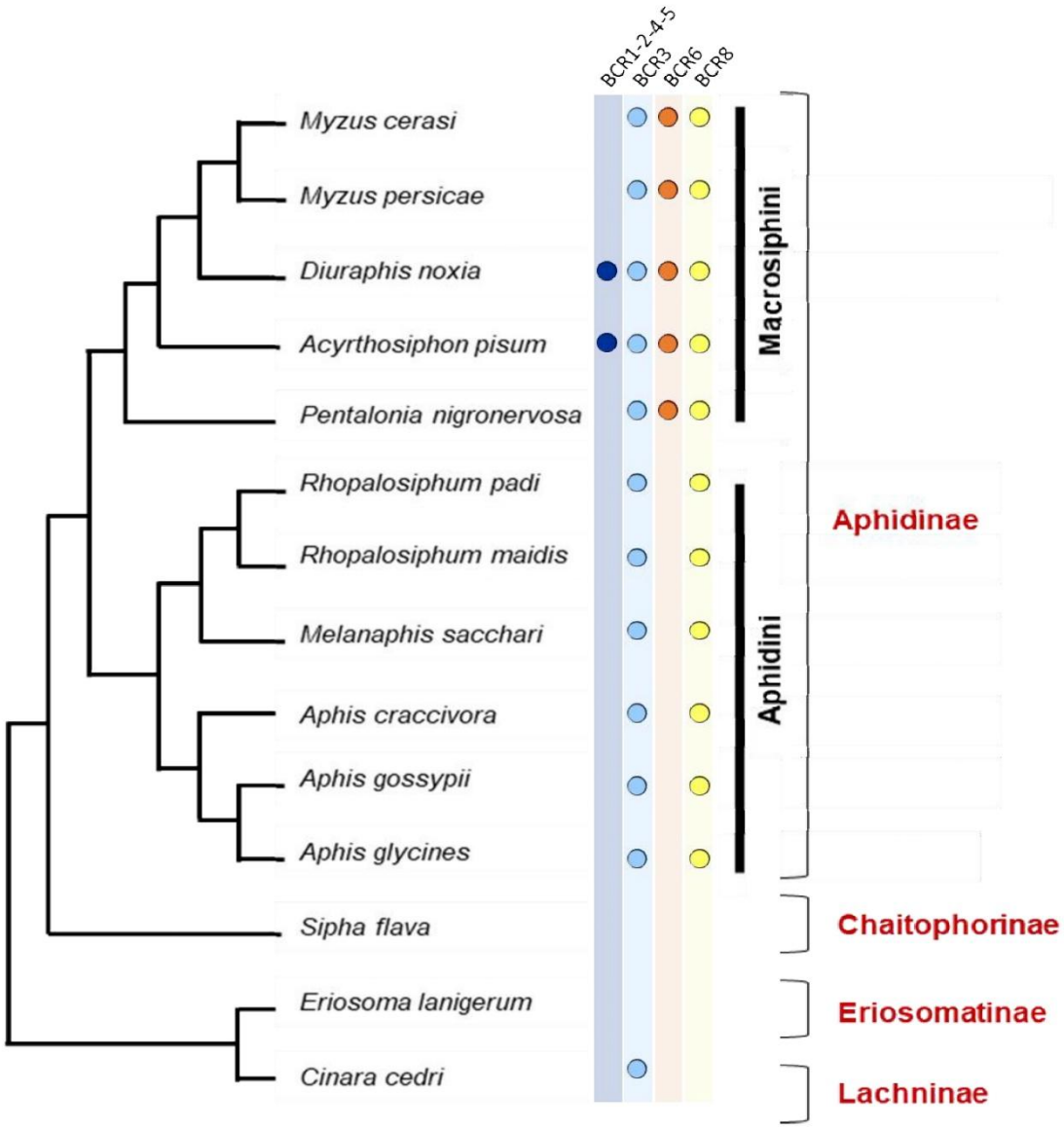


Figure 5. Partitioning of BCR peptides in aphid taxonomic groups. Phylogeny of the 14 members of the aphid group whose genome is annotated and available in databases (among the 19 with sequenced genomes). Their distributions into subfamilies and tribes are indicated in red and black, respectively (adapted from Calevro et al. [4]). Colored dots near each species name indicate whether a member of each BCR subfamily is present in the genome.

Thèse accessible à l'adresse : https://theses.insa-lyon.fr/publication/2025ISAL0089/these.pdf © [H. Terrasson], [2025], INSA Lyon, tous droits réservés

Table 4. NMR constraints and structural statistics.

NMR Restraints	
Distance Restraints	
Total NOE	923
Unambiguous	763
Ambiguous	160
Hydrogen bonds	16
Dihedral Angle Restraints	88
Disulfide bridges [a]	3
Structural Statistics (7PQW.pdb)	
Average Violations Per Structure	
NOEs $\geq$ 0.3Å	0
Hydrogen bonds $\geq$ 0.3Å	0
Dihedrals $\geq 15^{\circ}$	3
Dihedrals $\geq 10^{\circ}$	8
Average pairwise rmsd (Å)	backbone atoms 0.45 $\pm$ 0.14 heavy atoms 1.14 $\pm$ 0.15
Ramachandran Analysis	
Most favored region and allowed region	96.9
Generously allowed	0.7
Disallowed	2.4
Energies (kcal·mol^{-1}) [b]	
Electrostatic	-1631.48 ± 29.53
Van der Waals	-334.18 ± 11.14
Total energy	-1196.56 ± 31.80
Residual NOE energy	56.38 ± 5.28

[a] Introduced as ambiguous; [b] values are given as mean $\pm$ standard deviation (n = 20).

The 200 water-refined structures of BCR4 possess three disulfide bridges with identical pairings: C17–C34, C21–C32 and C25–C48. Among them, 20 structures were selected that were in agreement with all NMR experimental data and the standard covalent geometry. Coordinates were deposited as PDB entry 7PQW. Analysis of the 20 final structures with PROCHECK-NMR [40] showed that almost all of the residues (96.9%) are in the most favored or allowed regions of the Ramachandran diagram (Table 4).

BCR4 is folded into a compact globular unit consisting of an N-terminal tail (D1-T13) and an α-helix (I14-V24), followed by an antiparallel β-sheet composed of two short β-strands, β_1 C34-A37 and β_2 Q43-P46 (Figure 6). The 3D structure is stabilized by three disulfide bridges linking the α-helix to β_1 (C17-C34), to the loop C25-Y33 (C21-C32) and to the C-terminal tail (C25-C48), respectively.

A comparison of the BCR4 structure with 3D structures deposited in the PDB using the DALI server [41] identified only one structure with a somewhat similar fold, as defined by a low Z score of 2.1. This structure corresponds to a chimera peptide, which is not a natural peptide (pdb code 1WT7, named BUTX-MTX [42]). This structural comparison thus identifies the 3D structure of BCR4 as being a new fold, which is consistent with it being unique to the aphid lineage.

Thèse accessible à l'adresse : https://theses.insa-lyon.fr/publication/2025ISAL0089/these.pdf © [H. Terrasson], [2025], INSA Lyon, tous droits réservés

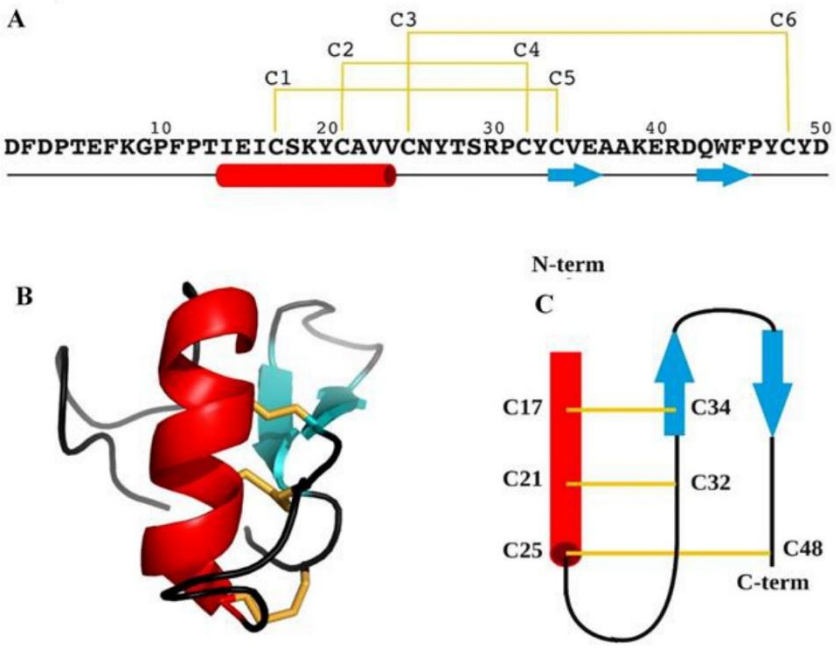


Figure 6. (**A**) Primary structure of BCR4 peptide. (**B**) Three-dimensional structure of BCR4. (**C**) Topology diagram of BCR4. α-helix, β-sheet, and random coil are represented in red, cyan and black, respectively. Disulfide bonds are colored in yellow.

3. Discussion

Thus far, most pest control strategies have relied on the use of systemic chemical pesticides, which are increasingly stigmatized because of their persistence in the environment and their toxicity to non-target organisms [6]. Thus, there is a need for new pest management solutions. Small Disulfide-Rich Proteins (DRPs) extracted from plants or arthropods are promising alternative biopesticide molecules [7,8,12]. Genomic plasticity of DRP-encoding sequences is known to foster the adaptability of organisms and to enable the acquisition of new functions [10]. In this work, we successfully produced in sufficient quantity and purity the folded form of BCR4 (Figure 2), a DRP encoded by the pea aphid genome and part of the BCR family of peptides, which was used to explore the insecticidal and structural properties of this protein. We showed that BCR4 strongly interferes with survival and growth of *A. pisum* in a dose-dependent manner (Figure 3). Its range of activity (5–80 µM, Figure 3) is similar to that displayed by PA1b, a promising plant biopesticide [9,12] active on the same insect target [43]. Importantly, from a functional perspective and as previously reported [22], BCR4 has a significant bactericidal effect on *E. coli* (Table 1), a free-living relative of *B. aphidicola*, the obligatory aphid endosymbiont [22]. Based on these results, we propose that the ingestion of exogenous BCR may block nymphal development and induce aphid death by interfering with the population density of this endosymbiont, essential for nymphal growth and survival [19].

From an evolutionary perspective, large-scale homology searches through genomic, transcriptomic and proteomic databases were performed to complete the repertoire of BCR peptides, which to date have been limited to the seven sequences identified in the pea aphid genome. Importantly, the 76 additional sequences we found (bringing the total number of BCR sequences identified to 83) are all encoded by aphid genomes (Figure 4). Phylogenetic analysis showed that aphid BCRs are organized into four subfamilies, including BCR1-2-4-5, BCR3, BCR6 and BCR8 sequences (Figure 3), respectively. BCRs from those four subfamilies

Thèse accessible à l'adresse : https://theses.insa-lyon.fr/publication/2025ISAL0089/these.pdf © [H. Terrasson], [2025], INSA Lyon, tous droits réservés

all have six or eight cysteine residues, and we observed a very clear intra-group conservation of cysteine topology (e.g., distribution in the sequence and disulfide pairing). However, as for other DRPs, BCRs present high sequence diversity in their inter-cysteine loops, preventing the detection of any firm homology with arthropod defensins at this point [10,24]. While BCR subfamilies had previously been reported [15], we were able to enrich each of them with many new members (Figure 4). We also showed that (i) aphids present varying numbers of BCR-encoding genes, from 1 to 13; and (ii) while BCR3 and BCR8 homologs are widely present in the aphid lineage, genes from the BCR1-2-4-5 and BCR6 subfamilies are restricted to the Macrosiphini tribe, which includes many major agricultural pests. This suggests a complex evolutionary history involving several events of gene duplication and losses with possible functional diversification of the resulting homologs.

The three-dimensional structure of BCR4 was determined by NMR spectroscopy, and subsequent protein fold analysis revealed that BCR4 belongs to an as-yet-unknown structural class of defensin proteins (Figure 6). Defensins are a well-characterized group of DRPs present in all eukaryote genomes [24]. Shaffee's phylogenetic work from Shaffee et al. [10,24] showed that defensins consist of two independent and convergent superfamilies, each derived from independent evolutionary events: the so-called trans-defensin superfamily is uniquely composed of the CSαβ (cysteine-stabilized α-helix β-sheet) family and the cis-defensin superfamily is composed of the α-, β-, θ-, and big defensin families. In contrast to the CSαβ family (Figure 7), the CXC motif (X denoting any amino acid residue) of BCR4 is in the first β-strand, leading to a different cysteine bonding pattern, i.e., the one corresponding to the β-defensin fold (the second family of defensin well-known as antimicrobial peptides) [10,24]. The fold of BCR4 is therefore a new type of defensin peptide, suggesting that BCRs constitute a new class of antimicrobial cysteine-rich protein. We here hypothesize that the defensins consist of at least three independent and convergent superfamilies: cis-, trans- and BCR defensins. BCR4 is the first member of this new defensin family with the cysteine bonding pattern of β-defensin and the structural motif of the CSαβ family (Figure 7).

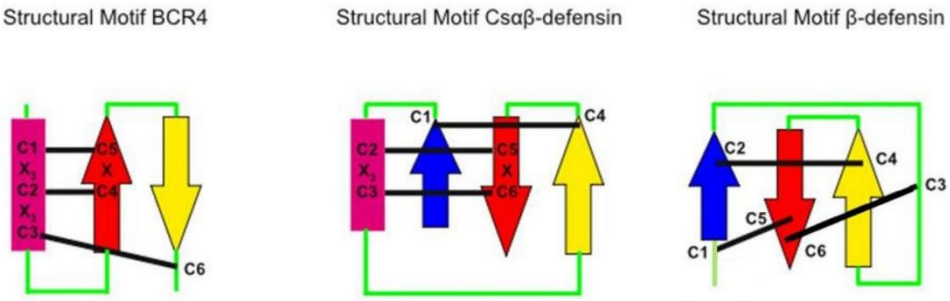


Figure 7. Disulfide connectivities in BCR4 peptide and in CSαβ and β-defensin groups. α-helices are indicated by rectangle, β-strands are represented by arrows, and disulfides in black lines.

BCRs are orphan genes exclusively expressed in aphid bacteriocytes. This gene family has probably evolved in aphid lineages to ensure several functions related to endosymbiosis, including bacteriocyte homeostasis and endosymbiont control. Studies on the cereal weevil *Sitophilus* have shown that the coleoptericin A (ColA) AMP selectively targets endosymbionts within bacteriocytes and impairs bacterial cytokinesis, thereby regulating bacterial cell division and preventing bacterial exit from weevil bacteriocytes [21,44]. Similar results were obtained in the *Rhizobium*-legumes symbiosis, where nodule-specific secreted peptides called NCRs have been shown to target bacteria and induce an irreversible elongation of bacteria, rendering them metabolically active but unable to multiply in vitro outside plant nodules [45]. In the actinorhizal plant *Alnus glutinosa*, nodules express defensin-like peptides, including the Ag5 peptide that targets symbiont vesicles and increases the permeability of vesicle membranes [46]. Small peptides are becoming emerging molecules that

Thèse accessible à l'adresse : https://theses.insa-lyon.fr/publication/2025ISAL0089/these.pdf © [H. Terrasson], [2025], INSA Lyon, tous droits réservés

target a variety of functions in host–symbiont interaction, including symbiont control and physiology [47]. Such a convergent evolution pattern is especially interesting with respect to its applications.

Overall, the susceptibility of aphids to BCR peptides may lead to the development of effective strategies for controlling such sap sucking pests. The exploration contained in this work may end up in a new protein family targeted to the specific control of aphids, which are some of the most important pests in global agriculture.

4. Materials and Methods

4.1. Peptide Synthesis

BCR4 was synthesized through native chemical ligation (NCL) of two peptide segments, followed by oxidative folding to form the three disulfide bridges, using previously described protocols [28–33]. Briefly, an N-terminal cysteinyl peptide segment (sequence: H-^{21}CAVVCNYTSRPCYCVEAAKERDQWFPYCY^{50}D-OH) and a C-terminal crypto-thioester segment (sequence: H-^{1}DFDPTEFKGPFPTIEICSK^{20}Y-(Hnb)C(S*t*Bu)G-NH_2) were synthesized on a Prelude peptide synthesizer (Protein Technologies, Tucson, AZ, USA) using standard Fmoc/*t*Bu chemistry at a 25 µmol scale and starting from a Tentagel resin equipped with a Rink's amide linker. The *N*-2-hydroxy-5-nitrobenzyl (Hnb) group was automatically introduced through resin reductive amination. Both peptide segments were purified by C_{18} reverse phase RP-HPLC on a Nucleosil C_{18} column (300 Å, 250 × 10 mm) (Macherey-Nagel, Düren, Germany), maintained at 25 °C. Solvent A was 0.1% trifluoroacetic acid (TFA) in water and B was 0.1% TFA in acetonitrile. A linear gradient from 20% B to 55% B was applied for 30 min at a flow rate of 3 mL/min and yielded the pure reduced form of BCR4 through collection of the peak identified as the target compound. The purified peptides were then chemoselectively coupled under standard NCL conditions (2 mM peptide segments, 50 mM tris-carboxyethylphosphine, 200 mM 4-mercaptophenylacetic acid, 6 M guanidinium chloride, 200 mM phosphate buffer, pH 6.5, 37 °C, 24 h) [28,29] and purified as before to retrieve the pure reduced form of BCR4 (sequence: H-^{1}DFDPTEFKGPFPTIEICSKYCAVVCNYTSRPCYCVEAAKERDQWFPYCY^{50}D-OH). The purified compound was further analyzed by ESI-HRMS on a Bruker maXisTM 22 ultra-high-resolution Q-TOF mass spectrometer (Bruker Daltonics, Bremen, Germany), in positive mode and a $[M+H]^+$ m/z ratio of 5897.5883 was found (theoretical monoisotopic m/z calculated for $C_{266}H_{379}N_{62}O_{79}S_6$: 5897.5869). Subsequently, the pure reduced form of BCR4 was oxidatively folded in vitro (10 µM peptide concentration, 0.1 mM oxidized glutathione, 1 mM glutathione, 1 mM EDTA, 100 mM TRIS, pH 8.5, 20 °C, 48 h) [34,48] before purification to homogeneity by C_{18} RP-HPLC. Analysis of the purified folded product via ESI-HRMS analysis gave results consistent with the formation of three disulfide bridges ($[M+H]^+$ m/z obtained: 5891.5437; theoretical monoisotopic m/z calculated for $C_{266}H_{373}N_{62}O_{79}S_6$: 5891.5400).

4.2. Antimicrobial Assays

E. coli and *M. luteus* were grown in Lysogeny Broth (LB) and Terrific Broth (TB) medium (Sigma-Aldrich, Saint-Louis, MO, USA), respectively. Antimicrobial assays were performed in sterile 96-well plates with a final volume of 100 µL per well, composed of 50 µL of culture and 50 µL of serially diluted peptides (5–80 µM). *E. coli* and *M. luteus* were added at an OD600 of 0.006 and 0.05, respectively. Plates were incubated at 30 °C for 24 h and growth was measured at 600 nm using a Power wave XS-Biotek plate reader (Bioteck Instrument, Colmar, France). The lowest concentration of BCR4 peptide showing complete inhibition was taken as minimal inhibitory concentration (MIC). All analyses were performed in triplicate, with the results expressed as mean ± standard deviation of mean (SEM).

Thèse accessible à l'adresse : https://theses.insa-lyon.fr/publication/2025ISAL0089/these.pdf © [H. Terrasson], [2025], INSA Lyon, tous droits réservés

4.3. Insects and Insect Assays

The aphid clone used was *A. pisum* LL01, a long-established alfalfa-collected clone containing only the primary endosymbiont *B. aphidicola.* Aphids were maintained on young broad bean plants (*Vicia faba* L. cv. Aguadulce) at 21 °C, with a photoperiod of 16 h light–8 h dark to obtain strictly parthenogenetic aphid matrilines, that were reared and synchronized as previously described [20].

For toxicity analyses, three groups of ten 1st instar nymphs (aged between 0 and 24 h) were collected and placed in *ad hoc* feeding chambers containing an AP3 artificial diet [49] supplemented with different doses (5 µM to 80 µM) of solubilized BCR4 peptide. Toxicity was evaluated by scoring survival daily over the whole nymphal life of the pea aphid (7 days) [50]. Growth was also measured by weighing adult aphids on a Mettler AE163 analytical microbalance (Mettler Toledo, Columbus, OH, USA) at the closest 10 µg, following the protocol described previously [51,52].

Aphid mortality data for all BCR4 concentrations were analyzed separately in a parametric survival analysis with a log-normal fit. Aphid weights were analyzed by ANOVA followed by Tukey–Kramer HSD test for comparing multiple means. All analyses were performed with JMP software version 11 (SAS Institute Cary USA, MacOS version).

4.4. Sequence Analysis and Phylogeny

Homologous BCR protein sequences were retrieved using a combination of TBLASTN and BLASTP [53,54] against the aphid genomes available from (i) AphidBase [36], (ii) the NCBI genome database and (iii) the whole NCBI non-redundant protein, nucleotide and EST databases (with *A. pisum* BCR as blast seeds; see Supplementary Materials Table S2 for a complete list of BCR protein sequences used for the phylogenetic analysis). BCR protein sequences were subjected to multiple sequence alignments using the MUSCLE program [55]. Subsequently, a phylogenetic tree was constructed, using the PhyML method [37] implemented in the Seaview software (v5.0.4) [37,56] (LG model with 4 rate classes), and the reliability of each branch was evaluated using the bootstrap method, with 1000 replicates. Poorly supported branches (<50%) were collapsed using TreeCollapseCL4 [38]. Graphical representation and editing of the phylogenetic tree were performed with FigTree (v1.4.3) [57].

4.5. NMR Experiments

Prior to NMR analysis, the synthesized BCR4 peptides were dissolved in H_2O:D_2O (9:1 ratio) at a concentration of 0.6 mM and pH was adjusted to 4.8. Then, 2D ^{1}H NOESY, 2D ^{1}H TOCSY, a sofast-HMQC [39] (^{15}N natural abundance) and a ^{13}C-HSQC (^{13}C natural abundance) were performed at 298 K on an Avance III HD BRUKER 700 MHz spectrometer equipped with a cryoprobe. ^{1}H chemical shifts were referenced to the water signal (4.77 ppm at 298 K). NMR data were processed using the Topspin software version 3.2^{TM} (Bruker, Billerica, MA, USA) and analyzed with CCPNMR version 2.2.2 [58].

4.6. Structure Calculations

Structures were calculated using the Cristallography and NMR System [59,60] through the automatic assignment software ARIA2 version 2.3 [61] with NOE-derived distances, hydrogen bonds (in accordance with the observation of typical long- or medium-distance NOE cross peak network for β-sheets and α-helices respectively—HN/HN, HN/Hα, Hα/Hα), backbone dihedral angle restraints (determined with the DANGLE program [62]) and three ambiguous disulfide bridges. The ARIA2 protocol, with default parameters used, simulated annealing with torsion angle and Cartesian space dynamics. The iterative process was repeated until the assignment of the NOE cross peaks was complete. The last run for BCR4 was performed with 1000 initial structures and 200 structures were refined in water. Twenty structures were selected on the basis of total energies and restraint violation statistics, to represent the structure of BCR4 in solution. The quality of the final

Thèse accessible à l'adresse : https://theses.insa-lyon.fr/publication/2025ISAL0089/these.pdf © [H. Terrasson], [2025], INSA Lyon, tous droits réservés

structures was evaluated using PROCHECK-NMR [40] and PROMOTIF [63]. The figures were prepared with PYMOL [64].

4.7. Structure Relationship of BCR4 Structure

Comparison of the BCR4 3D structure to the PDB database was performed using the DALI server [41].

Supplementary Materials: The following supporting information can be downloaded at: https://www.mdpi.com/article/10.3390/ijms232012480/s1, References [65,66] are cited in the supplementary materials.

Author Contributions: Conceptualization, K.L., N.P., F.P., A.F.D., V.A., A.H., F.C. and P.d.S.; methodology, K.L., N.P., F.P., A.F.D., V.A., A.H., F.C. and P.d.S.; validation, K.L., N.P., F.P., A.F.D., V.A., F.C. and P.d.S.; formal analysis, K.L., N.P., F.P., A.F.D., V.A., F.C. and P.d.S.; investigation, K.L., N.P., F.P., H.T., C.S., I.R., M.R.L., A.F.D., V.A., A.H., F.C. and P.d.S.; resources, K.G. and G.D.; data curation, K.L., N.P., F.P., M.R.L., A.F.D., V.A., F.C. and P.d.S.; writing—original draft preparation, K.L., N.P., F.P., A.F.D., V.A. and P.d.S.; writing—review and editing, K.L., N.P., F.P., M.R.L., A.F.D., V.A., A.H., F.C. and P.d.S.; visualization, K.L., N.P., F.P., A.F.D., V.A., A.H., F.C. and P.d.S.; supervision, V.A., A.F.D., F.C. and P.d.S.; project administration, V.A. and P.d.S.; funding acquisition, N.P., F.P., V.A., A.F.D., F.C. and P.d.S. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: This work was supported by INRAE (Institut National de Recherche pour l'Agriculture, l'Alimentation et l'Environnement), INSA Lyon (Institut National des Sciences Appliquées Lyon) and the French ANR-119-CE11-0004-01 (Biofamily) program grant.

Institutional Review Board Statement: Not applicable.

Informed Consent Statement: Not applicable.

Data Availability Statement: All data are contained within the manuscript and its supporting information.

Acknowledgments: The authors thank the NMR sub-platform of the MO2VING facility (Orléans, France). We thank Philippe Marceau and Jean-Baptiste Madinier for assistance in solid phase peptide synthesis and Patrick Callaerts for careful reading of the English language.

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interests.

References

1. Bradshaw, C.J.A.; Leroy, B.; Bellard, C.; Roiz, D.; Albert, C.; Fournier, A.; Barbet-Massin, M.; Salles, J.-M.; Simard, F.; Courchamp, F. Massive yet grossly underestimated global costs of invasive insects. *Nat. Commun.* **2016**, *7*, 12986. [CrossRef] [PubMed]
2. Diagne, C.; Leroy, B.; Gozlan, R.E.; Vaissiere, A.C.; Assailly, C.; Nuninger, L.; Roiz, D.; Jourdain, F.; Jaric, I.; Courchamp, F. InvaCost, a public database of the economic costs of biological invasions worldwide. *Sci. Data* **2020**, *7*, 277. [CrossRef] [PubMed]
3. Oerke, E.C.; Dehne, H.W. Safeguarding production—Losses in major crops and the role of crop protection. *Crop Prot.* **2004**, *23*, 275–285. [CrossRef]
4. Calevro, F.; Tagu, D.; Callaerts, P. *Acyrthosiphon pisum*. *Trends Genet. TIG* **2019**, *35*, 781–782. [CrossRef]
5. Dedryver, C.A.; Le Ralec, A.; Fabre, F. The conflicting relationships between aphids and men: A review of aphid damage and control strategies. *Comptes. Rendus. Biol.* **2010**, *333*, 539–553. [CrossRef] [PubMed]
6. Goulson, D. Call to restrict neonicotinoids. *Science* **2018**, *360*, 973. [CrossRef] [PubMed]
7. Huang, Y.H.; Du, Q.; Craik, D.J. Cyclotides: Disulfide-Rich peptide toxins in plants. *Toxicon* **2019**, *172*, 33–44. [CrossRef] [PubMed]
8. King, G.F. Tying pest insects in knots: The deployment of spider-venom-derived knottins as bioinsecticides. *Pest. Manag. Sci.* **2019**, *75*, 2437–2445. [CrossRef] [PubMed]
9. Gressent, F.; Da Silva, P.; Eyraud, V.; Karaki, L.; Royer, C. Pea Albumin 1 subunit b (PA1b), a promising bioinsecticide of plant origin. *Toxins* **2011**, *3*, 1502–1517. [CrossRef]
10. Shafee, T.M.; Lay, F.T.; Phan, T.K.; Anderson, M.A.; Hulett, M.D. Convergent evolution of defensin sequence, structure and function. *Cell. Mol. Life Sci.* **2017**, *74*, 663–682. [CrossRef]
11. Gonzalez-Castro, R.; Gomez-Lim, M.A.; Plisson, F. Cysteine-Rich Peptides: Hyperstable Scaffolds for Protein Engineering. *Chembiochem. A Eur. J. Chem. Biol.* **2021**, *22*, 961–973. [CrossRef]
12. Rahioui, I.; Eyraud, V.; Karaki, L.; Sasse, F.; Carre-Pierrat, M.; Qin, A.; Zheng, M.H.; Toepfer, S.; Sivignon, C.; Royer, C.; et al. Host range of the potential biopesticide Pea Albumin 1b (PA1b) is limited to insects. *Toxicon* **2014**, *89*, 67–76. [CrossRef] [PubMed]

Thèse accessible à l'adresse : https://theses.insa-lyon.fr/publication/2025ISAL0089/these.pdf © [H. Terrasson], [2025], INSA Lyon, tous droits réservés

13. Bell, J.; Sukiran, N.A.; Walsh, S.; Fitches, E.C. The insecticidal activity of recombinant nemertide toxin alpha-1 from *Lineus longissimus* towards pests and beneficial species. *Toxicon* **2021**, *197*, 79–86. [CrossRef] [PubMed]
14. Delobel, B.; Grenier, A.M.; Gueguen, J.; Ferrasson, E.; Mbaiguinam, M. Utilisation d'un polypeptide dérivé d'une albumine PA1b de légumineuse comme insecticide (Brevet-98/05877). *French Patent* **1998**, *98*, 11.
15. Shigenobu, S.; Stern, D.L. Aphids evolved novel secreted proteins for symbiosis with bacterial endosymbiont. *Proc. Biol. Sci.* **2013**, *280*, 20121952. [CrossRef] [PubMed]
16. Baumann, P. Biology bacteriocyte-associated endosymbionts of plant sap-sucking insects. *Annu. Rev. Microbiol.* **2005**, *59*, 155–189. [CrossRef] [PubMed]
17. Douglas, A.E. Multiorganismal insects: Diversity and function of resident microorganisms. *Annu. Rev. Entomol.* **2015**, *60*, 17–34. [CrossRef] [PubMed]
18. Shigenobu, S.; Watanabe, H.; Hattori, M.; Sakaki, Y.; Ishikawa, H. Genome sequence of the endocellular bacterial symbiont of aphids Buchnera sp APS. *Nature* **2000**, *407*, 81–86. [CrossRef] [PubMed]
19. Brinza, L.; Viñuelas, J.; Cottret, L.; Calevro, F.; Rahbé, Y.; Febvay, G.; Duport, G.; Colella, S.; Rabatel, A.; Gautier, C.; et al. Systemic analysis of the symbiotic function of Buchnera aphidicola, the primary endosymbiont of the pea aphid *Acyrthosiphon pisum*. *Comptes. Rendus. Biol.* **2009**, *332*, 1034–1049. [CrossRef] [PubMed]
20. Simonet, P.; Gaget, K.; Balmand, S.; Ribeiro Lopes, M.; Parisot, N.; Buhler, K.; Duport, G.; Vulsteke, V.; Febvay, G.; Heddi, A.; et al. Bacteriocyte cell death in the pea aphid/Buchnera symbiotic system. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2018**, *115*, E1819–E1828. [CrossRef] [PubMed]
21. Login, F.H.; Balmand, S.; Vallier, A.; Vincent-Monegat, C.; Vigneron, A.; Weiss-Gayet, M.; Rochat, D.; Heddi, A. Antimicrobial peptides keep insect endosymbionts under control. *Science* **2011**, *334*, 362–365. [CrossRef] [PubMed]
22. Uchi, N.; Fukudome, M.; Nozaki, N.; Suzuki, M.; Osuki, K.I.; Shigenobu, S.; Uchiumi, T. Antimicrobial Activities of Cysteine-rich Peptides Specific to Bacteriocytes of the Pea Aphid *Acyrthosiphon pisum*. *Microbes Environ.* **2019**, *34*, 155–160. [CrossRef]
23. Teufel, F.; Almagro Armenteros, J.J.; Johansen, A.R.; Gislason, M.H.; Pihl, S.I.; Tsirigos, K.D.; Winther, O.; Brunak, S.; von Heijne, G.; Nielsen, H. SignalP 6.0 predicts all five types of signal peptides using protein language models. *Nat. Biotechnol.* **2022**, *40*, 1023–1025. [CrossRef]
24. Shafee, T.M.; Lay, F.T.; Hulett, M.D.; Anderson, M.A. The Defensins Consist of Two Independent, Convergent Protein Superfamilies. *Mol. Biol. Evol.* **2016**, *33*, 2345–2356. [CrossRef]
25. Huygens, C.; Ribeiro Lopes, M.; Gaget, K.; Duport, G.; Peignier, S.; De Groef, S.; Parisot, N.; Calevro, F.; Callaerts, P. Evolutionary diversification of insulin-related peptides (IRPs) in aphids and spatiotemporal distribution in *Acyrthosiphon pisum*. *Insect Biochem. Mol. Biol.* **2022**, *141*, 103670. [CrossRef]
26. Ribeiro Lopes, M.; Parisot, N.; Gaget, K.; Huygens, C.; Peignier, S.; Duport, G.; Orlans, J.; Charles, H.; Baatsen, P.; Jousselin, E.; et al. Evolutionary novelty in the apoptotic pathway of aphids. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2020**, *117*, 32545–32556. [CrossRef] [PubMed]
27. Dawson, P.E.; Muir, T.W.; Clark-Lewis, I.; Kent, S.B. Synthesis of proteins by native chemical ligation. *Science* **1994**, *266*, 776–779. [CrossRef] [PubMed]
28. Lelievre, D.; Terrier, V.P.; Delmas, A.F.; Aucagne, V. Native Chemical Ligation Strategy to Overcome Side Reactions during Fmoc-Based Synthesis of C-Terminal Cysteine-Containing Peptides. *Org. Lett.* **2016**, *18*, 920–923. [CrossRef] [PubMed]
29. Terrier, V.P.; Adihou, H.; Arnould, M.; Delmas, A.F.; Aucagne, V. A straightforward method for automated Fmoc-based synthesis of bio-inspired peptide crypto-thioesters. *Chem. Sci.* **2016**, *7*, 339–345. [CrossRef]
30. Terrier, V.P.; Delmas, A.F.; Aucagne, V. Efficient synthesis of cysteine-rich cyclic peptides through intramolecular native chemical ligation of N-Hnb-Cys peptide crypto-thioesters. *Org. Biomol. Chem.* **2017**, *15*, 316–319. [CrossRef]
31. Abboud, S.A.; Amoura, M.; Madinier, J.B.; Renoux, B.; Papot, S.; Piller, V.; Aucagne, V. Enzyme-Cleavable Linkers for Protein Chemical Synthesis through Solid-Phase Ligations. *Angew. Chem.* **2021**, *60*, 18612–18618. [CrossRef]
32. Abboud, S.A.; Aucagne, V. An optimized protocol for the synthesis of N-2-hydroxybenzyl-cysteine peptide crypto-thioesters. *Org. Biomol. Chem.* **2020**, *18*, 8199–8208. [CrossRef] [PubMed]
33. Abboud, S.A.; Cisse, E.H.; Doudeau, M.; Benedetti, H.; Aucagne, V. A straightforward methodology to overcome solubility challenges for N-terminal cysteinyl peptide segments used in native chemical ligation. *Chem. Sci.* **2021**, *12*, 3194–3201. [CrossRef] [PubMed]
34. Derache, C.; Meudal, H.; Aucagne, V.; Mark, K.J.; Cadene, M.; Delmas, A.F.; Lalmanach, A.C.; Landon, C. Initial insights into structure-activity relationships of avian defensins. *J. Biol. Chem.* **2012**, *287*, 7746–7755. [CrossRef] [PubMed]
35. Martinez, G.; Hograindleur, J.P.; Voisin, S.; Abi Nahed, R.; Abd El Aziz, T.M.; Escoffier, J.; Bessonnat, J.; Fovet, C.M.; De Waard, M.; Hennebicq, S.; et al. Spermaurin, an La1-like peptide from the venom of the scorpion Scorpio *Maurus palmatus*, improves sperm motility and fertilization in different mammalian species. *Mol. Hum. Reprod.* **2016**, *23*, 116–131. [CrossRef]
36. Legeai, F.; Shigenobu, S.; Gauthier, J.P.; Colbourne, J.; Rispe, C.; Collin, O.; Richards, S.; Wilson, A.C.; Murphy, T.; Tagu, D. AphidBase: A centralized bioinformatic resource for annotation of the pea aphid genome. *Insect Mol. Biol.* **2010**, *19*, 5–12. [CrossRef]
37. Guindon, S.; Dufayard, J.F.; Lefort, V.; Anisimova, M.; Hordijk, W.; Gascuel, O. New algorithms and methods to estimate maximum-likelihood phylogenies: Assessing the performance of PhyML 3.0. *Syst. Biol.* **2010**, *59*, 390–401. [CrossRef]
38. Hodcroft, E. TreeCollapseCL 4. Available online: http://emmahodcroft.com/treecollapsecl.html (accessed on 22 July 2022).

Thèse accessible à l'adresse : https://theses.insa-lyon.fr/publication/2025ISAL0089/these.pdf © [H. Terrasson], [2025], INSA Lyon, tous droits réservés

39. Schanda, P.; Kupce, E.; Brutscher, B. SOFAST-HMQC experiments for recording two-dimensional heteronuclear correlation spectra of proteins within a few seconds. *J. Biomol. NMR* **2005**, *33*, 199–211. [CrossRef]
40. Laskowski, R.A.; Rullmann, J.A.C.; MacArthur, M.W.; Kaptein, R.; Thornton, J.M. AQUA and PROCHECK-NMR: Programs for checking the quality of protein structures solved by NMR. *J. Biomol. NMR* **1996**, *8*, 477–486. [CrossRef]
41. Holm, L. Dali server: Structural unification of protein families. *Nucleic Acids Res.* **2022**, *50*, W210–W215. [CrossRef]
42. M'Barek, S.; Chagot, B.; Andreotti, N.; Visan, V.; Mansuelle, P.; Grissmer, S.; Marrakchi, M.; El Ayeb, M.; Sampieri, F.; Darbon, H.; et al. Increasing the molecular contacts between maurotoxin and Kv1.2 channel augments ligand affinity. *Proteins* **2005**, *60*, 401–411. [CrossRef] [PubMed]
43. Gressent, F.; Duport, G.; Rahioui, I.; Pauchet, Y.; Bolland, P.; Specty, O.; Rahbe, Y. Biological activity and binding site characteristics of the PA1b entomotoxin on insects from different orders. *J. Insect Sci.* **2007**, *7*, 12. [CrossRef]
44. Login, F.H.; Heddi, A. Insect immune system maintains long-term resident bacteria through a local response. *J. Insect Physiol.* **2013**, *59*, 232–239. [CrossRef] [PubMed]
45. Van de Velde, W.; Zehirov, G.; Szatmari, A.; Debreczeny, M.; Ishihara, H.; Kevei, Z.; Farkas, A.; Mikulass, K.; Nagy, A.; Tiricz, H.; et al. Plant peptides govern terminal differentiation of bacteria in symbiosis. *Science* **2010**, *327*, 1122–1126. [CrossRef]
46. Carro, L.; Pujic, P.; Alloisio, N.; Fournier, P.; Boubakri, H.; Hay, A.E.; Poly, F.; Francois, P.; Hocher, V.; Mergaert, P.; et al. Alnus peptides modify membrane porosity and induce the release of nitrogen-rich metabolites from nitrogen-fixing Frankia. *ISME J.* **2015**, *9*, 1723–1733. [CrossRef]
47. Mergaert, P.; Kikuchi, Y.; Shigenobu, S.; Nowack, E.C.M. Metabolic Integration of Bacterial Endosymbionts through Antimicrobial Peptides. *Trends Microbiol.* **2017**, *25*, 703–712. [CrossRef] [PubMed]
48. Silva, P.; Strzepa, A.; Jouvensal, L.; Rahioui, I.; Gressent, F.; Delmas, A.F. A folded and functional synthetic PA1b, an interlocked entomotoxic miniprotein. *Biopolymers* **2009**, *92*, 436–444. [CrossRef] [PubMed]
49. Febvay, G.; Delobel, B.; Rahbe, Y. Influence of the Amino-Acid Balance on the Improvement of an Artificial Diet for a Biotype of *Acyrthosiphon-Pisum* (Homoptera, Aphididae). *Can. J. Zool.* **1988**, *66*, 2449–2453. [CrossRef]
50. Simonet, P.; Gaget, K.; Parisot, N.; Duport, G.; Rey, M.; Febvay, G.; Charles, H.; Callaerts, P.; Colella, S.; Calevro, F. Disruption of phenylalanine hydroxylase reduces adult lifespan and fecundity, and impairs embryonic development in parthenogenetic pea aphids. *Sci. Rep.* **2016**, *6*, 34321. [CrossRef]
51. Loth, K.; Costechareyre, D.; Effantin, G.; Rahbe, Y.; Condemine, G.; Landon, C.; da Silva, P. New Cyt-like delta-endotoxins from *Dickeya dadantii*: Structure and aphicidal activity. *Sci. Rep.* **2015**, *5*, 8791. [CrossRef]
52. Rahbe, Y.; Febvay, G. Protein Toxicity to Aphids—An Invitro Test on *Acyrthosiphon-Pisum*. *Entomol. Exp. Appl.* **1993**, *67*, 149–160. [CrossRef]
53. Altschul, S.F.; Madden, T.L.; Schaffer, A.A.; Zhang, J.H.; Zhang, Z.; Miller, W.; Lipman, D.J. Gapped BLAST and PSI-BLAST: A new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Res.* **1997**, *25*, 3389–3402. [CrossRef] [PubMed]
54. Boratyn, G.M.; Schaffer, A.A.; Agarwala, R.; Altschul, S.F.; Lipman, D.J.; Madden, T.L. Domain enhanced lookup time accelerated BLAST. *Biol. Direct.* **2012**, *7*, 727–741. [CrossRef] [PubMed]
55. Edgar, R.C. MUSCLE: Multiple sequence alignment with high accuracy and high throughput. *Nucleic Acids Res.* **2004**, *32*, 1792–1797. [CrossRef] [PubMed]
56. Gouy, M.; Guindon, S.; Gascuel, O. SeaView version 4: A multiplatform graphical user interface for sequence alignment and phylogenetic tree building. *Mol. Biol. Evol.* **2010**, *27*, 19854763. [CrossRef]
57. Drummond, A.J.; Rambaut, A. BEAST: Bayesian evolutionary analysis by sampling trees. *BMC Evol. Biol.* **2007**, *7*, 214. [CrossRef]
58. Vranken, W.F.; Boucher, W.; Stevens, T.J.; Fogh, R.H.; Pajon, A.; Llinas, P.; Ulrich, E.L.; Markley, J.L.; Ionides, J.; Laue, E.D. The CCPN data model for NMR spectroscopy: Development of a software pipeline. *Proteins* **2005**, *59*, 687–696. [CrossRef]
59. Brunger, A.T. Version 1.2 of the Crystallography and NMR system. *Nat. Protoc.* **2007**, *2*, 2728–2733. [CrossRef]
60. Brunger, A.T.; Adams, P.D.; Clore, G.M.; DeLano, W.L.; Gros, P.; Grosse-Kunstleve, R.W.; Jiang, J.S.; Kuszewski, J.; Nilges, M.; Pannu, N.S.; et al. Crystallography & NMR system: A new software suite for macromolecular structure determination. *Acta Cryst. D* **1998**, *54*, 905–921. [CrossRef]
61. Rieping, W.; Habeck, M.; Bardiaux, B.; Bernard, A.; Malliavin, T.E.; Nilges, M. ARIA2: Automated NOE assignment and data integration in NMR structure calculation. *Bioinformatics* **2007**, *23*, 381–382. [CrossRef]
62. Cheung, M.S.; Maguire, M.L.; Stevens, T.J.; Broadhurst, R.W. DANGLE: A Bayesian inferential method for predicting protein backbone dihedral angles and secondary structure. *J. Magn. Reson.* **2010**, *202*, 223–233. [CrossRef] [PubMed]
63. Hutchinson, E.G.; Thornton, J.M. PROMOTIF—A program to identify and analyze structural motifs in proteins. *Protein Sci.* **1996**, *5*, 212–220. [CrossRef] [PubMed]
64. De Lano, W.L. *Pymol*; DeLano Scientific: South San Francisco, CA, USA, 2002.
65. Piszkiewicz, D.; Landon, M.; Smith, E.L. Anomalous cleavage of aspartyl-proline peptide bonds during amino acid sequence determinations. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **1970**, *40*, 1173–1178. [CrossRef]
66. Segalas, I.; Thai, R.; Menez, R.; Vita, C. A particularly labile Asp–Pro bond in the green mamba muscarinic toxin Mtx2—Effect of protein conformation on the rate of cleavage. *FEBS Lett.* **1995**, *371*, 171–175. [CrossRef]

Thèse accessible à l'adresse : https://theses.insa-lyon.fr/publication/2025ISAL0089/these.pdf © [H. Terrasson], [2025], INSA Lyon, tous droits réservés

Thèse accessible à l'adresse : https://theses.insa-lyon.fr/publication/2025ISAL0089/these.pdf © [H. Terrasson], [2025], INSA Lyon, tous droits réservés

CHAPITRE 2
ETUDE DES EFFETS TOXIQUES DE BCR4

L'étude Loth et al (2022) présentée dans le chapitre précédent révèle que BCR4, possède une activité insecticide par ingestion chez le puceron du pois. Ce résultat est particulièrement intéressant lorsque l'on sait que ce peptide est synthétisé à l'origine par le puceron lui-même. Par ailleurs, on sait que BCR4 présente une activité bactéricide *in vitro* contre *E. coli*, une bactérie phylogénétiquement proche de *B. aphidicola*. Se pourrait-il que le BCR4 ingéré possède également une activité bactéricide *in vivo* ? Et au-delà de la mortalité engendrée, quels sont les effets de l'ingestion de BCR4 sur le puceron, d'un point de vue anatomique et développemental, ainsi que sur les bactériocytes et les symbiotes qu'ils hébergent ?

D'un point de vue appliqué, BCR4 est un candidat prometteur en tant que biopesticide ciblant potentiellement les pucerons. Cependant, on sait que la présence de symbiotes secondaires peut moduler la réponse des pucerons face à certains stress, notamment l'exposition à des substances xénobiotiques (Lemoine *et al.*, 2020 ; Zytynska *et al.*, 2021). De plus, la majorité des pucerons échantillonnés dans la nature hébergent au moins un symbiote facultatif (Leclair *et al.*, 2021). L'étude précédente s'est intéressée uniquement à la lignée LL01, mono-symbiotique (*i.e.* porteuse uniquement de *B. aphidicola*). La toxicité de BCR4 varie-t-elle chez *A. pisum* en présence d'un symbiote facultatif ?

Afin de répondre à ces questions, nous avons mené des analyses de survie et de masse, couplées à des analyses histologiques et à des quantifications de symbiotes, afin d'étudier en détail les effets de l'ingestion de BCR4 sur *A. pisum*. En plus de la lignée LL01, nous avons étudié ces effets sur la lignée YR2-*Ri,* qui contient également le symbiote facultatif *R. insecticola*, vivant en dehors des bactériocytes du puceron du pois. Afin de distinguer les éventuelles différences dues non pas au statut symbiotique des individus, mais à leur fond génétique, cette étude a également été menée sur la lignée YR2-amp, issue de YR2-*Ri,* dont le symbiote facultatif a été retiré par traitement antibiotique.

L'étude Terrasson *et al.* (2025) présentée dans ce chapitre, confirme l'activité insecticide de BCR4 vis-à-vis de *A. pisum*, avec un effet sur la survie

Thèse accessible à l'adresse : https://theses.insa-lyon.fr/publication/2025ISAL0089/these.pdf © [H. Terrasson], [2025], INSA Lyon, tous droits réservés

plus prononcée chez LL01 que chez les deux lignées YR2 (Figure 1 de l'article Terrasson *et al.*, 2025). Cela montre que YR2 est plus résistante indépendamment de son statut symbiotique. L'étude montre également un impact dose-dépendant du traitement sur le développement des individus, avec une très forte réduction de leur masse, quelle que soit la lignée considérée. Comme pour la survie, la lignée LL01 est la plus impactée, YR2-amp est la moins touchée, et YR2-*Ri* présente un effet intermédiaire. Chez les lignées YR2, la diminution de la masse semble être aggravée par la présence du symbiote facultatif.

L'analyse des tissus des pucerons traités, réalisée par des dissections et des observations des coupes histologiques, révèle que l'ingestion de BCR4 entraine une forte réduction du nombre d'embryons présents dans les individus, ainsi qu'un dysfonctionnement de leur développement. En effet, contrairement aux contrôles, les rares embryons observés chez les individus traités ne présentaient ni appendices, ni pigmentations, ni yeux visibles en dissection. En histologie, il était impossible de distinguer leurs organes (Figure 4 de l'article Terrasson *et al.*, 2025). Leurs bactériocytes n'étaient pas encore individualisés et regroupés au pôle postérieur des embryons, contrairement aux embryons témoins chez qui ils sont cellularisés et organisés autour du tube digestif. Ces observations traduisent un dysfonctionnement et/ou un retard du développement embryonnaire.

En plus de ces effets physiologiques marqués, l'analyse de la quantité de symbiotes par cytométrie en flux, utilisant la méthode développée au laboratoire par Simonet *et al.* (2016b), révèle que l'ingestion de BCR4 provoque une réduction drastique du nombre de *Buchnera* avec une baisse de 86%, 73% et 84% chez LL01, YR2-amp et YR2-*Ri* respectivement, par rapport aux témoins. La quantité de *Regiella* chez YR2-*Ri* a diminuée fortement, mais dans une moindre mesure que *Buchnera*, avec une réduction de 58%.

En résumé, cette étude montre que l'ingestion de BCR4 impacte à la fois la survie, la masse, le développement embryonnaire et les symbiotes du puceron du pois. Ces effets pourraient s'expliquer par une action bactéricide de BCR4 sur les symbiotes *in vivo*, et plus particulièrement sur le symbiote primaire obligatoire *Buchnera*. Il est possible que le BCR4 endogène du puceron agissent de manière similaire, soit en ralentissant la croissance, soit en éliminant les symbiotes, diminuant ainsi leur nombre.

Thèse accessible à l'adresse : https://theses.insa-lyon.fr/publication/2025ISAL0089/these.pdf © [H. Terrasson], [2025], INSA Lyon, tous droits réservés

L’ensemble de ces résultats a fait l’objet d’une publication en 2025 dans la revue *Journal of Pest Science* et constitue l’Article 2 de ce manuscrit. Ils seront plus amplement discutés dans la section **Discussion générale** de ce manuscrit.

Thèse accessible à l'adresse : https://theses.insa-lyon.fr/publication/2025ISAL0089/these.pdf © [H. Terrasson], [2025], INSA Lyon, tous droits réservés

Article 2 : Strong impact of orally administered BCR4 defensin on aphid survival, embryo development and symbiotic cells in three *Acyrthosiphon pisum* parthenogenetic lines.

Article publié dans la revue Journal of Pest Science :

Terrasson, H., Gaget, K., Lapetoule, G., Rahioui, I., Renoz, F., Benhamou, S., Jouve, C., Sivignon, C., Duport, G., Aucagne, V., Simon, J.-C., Ribeiro-Lopes, M., Calevro, F., & Silva, P. D. (2025). **Strong impact of orally administered BCR4 defensin on aphid survival, embryo development and symbiotic cells in three *Acyrthosiphon pisum* parthenogenetic lines**. *Journal of Pest Science*. https://doi.org/10.1007/s10340-025-01923-0

Thèse accessible à l'adresse : https://theses.insa-lyon.fr/publication/2025ISAL0089/these.pdf © [H. Terrasson], [2025], INSA Lyon, tous droits réservés

Journal of Pest Science
https://doi.org/10.1007/s10340-025-01923-0

Strong impact of orally administered BCR4 defensin on aphid survival, embryo development, and symbiotic cells in three *Acyrthosiphon pisum* parthenogenetic lines

Hugo Terrasson[1] · Karen Gaget[1] · Garance Lapetoule[1] · Isabelle Rahioui[1] · François Renoz[2] · Sylvain Benhamou[1] · Chrystèle Jouve[1] · Catherine Sivignon[1] · Gabrielle Duport[1] · Vincent Aucagne[3] · Jean-Christophe Simon[4] · Mélanie Ribeiro Lopes[1] · Federica Calevro[1] · Pedro Da Silva[1]

Received: 4 November 2024 / Revised: 5 March 2025 / Accepted: 7 May 2025
© The Author(s), under exclusive licence to Springer-Verlag GmbH Germany, part of Springer Nature 2025

Abstract
Aphids are major crop pests capable of colonizing the main plants grown for human consumption. They have specialized cells, the bacteriocytes, which house the obligate symbiont *Buchnera aphidicola* that provide them with essential nutrients missing from their diet. Bacteriocyte-specific cysteine-rich peptides (BCRs) are encoded by a defensin gene family exclusively present in aphids and specifically expressed in bacteriocytes. One BCR family member, BCR4, has been shown to have insecticidal properties against the pea aphid, *Acyrthosiphon pisum* (Hemiptera: Aphididae). In the present study, we exposed the pea aphid to different doses of BCR4 and examined the impact on aphid survival, mass, anatomy, and fecundity, as well as on bacterial symbiosis. As different pea aphid lines with various symbiotic status may be differently affected by stress, we investigated the effect of BCR4 ingestion on three different *A. pisum* lines: LL01 and YR2-amp, that are mono-infected with *B. aphidicola*, and YR2-*Ri*, that is genetically identical to YR2-amp but also contains the extracellular facultative symbiont *Regiella insecticola*. Our results show a strong dose–response effect of BCR4 on LL01 survival and a more moderate effect on both YR2 lines, while an impact on the mass was observed in the three lines. Histological analyses revealed severe embryonic developmental defects due to the treatment. Finally, BCR4 treatment reduced symbiont quantity, with *B. aphidicola* being more affected than *R. insecticola*. This study supports the hypothesis that BCR4 could act as a key regulator of aphid symbiosis and development and highlights its potential as a candidate bioinsecticide for pest control.

Keywords Aphididae · Bacteriocyte-specific cysteine-rich peptide · Bio-insecticidal peptide · Symbiont · Pest management

Key message

- BCR4 belongs to a new defensin family of peptides whose role in aphid symbiosis remains elusive
- BCR4 ingestion affects aphid survival, weight, and embryo development in a dose-dependent manner
- Susceptibility of aphids to BCR4 varies with the genetic background and symbiotic status
- BCR4 lowers symbiont populations, affecting Buchnera aphidicola more than Regiella insecticola
- BCR4 is a promising insecticide candidate for aphid management

Communicated by Subba Palli.

✉ Federica Calevro
federica.calevro@inrae.fr

✉ Pedro Da Silva
pedro.da-silva@insa-lyon.fr

[1] INSA Lyon, INRAE, BF2I, UMR203, 69621 Villeurbanne, France

[2] Biodiversity Research Centre, Earth and Life Institute, UCLouvain, Louvain-la-Neuve, Belgium

[3] Centre de Biophysique Moléculaire, CNRS UPR 4301, 45071 Orléans, France

[4] INRAE, UMR IGEPP, Institut Agro, Université de Rennes, Le Rheu, France

Published online: 18 June 2025

Thèse accessible à l'adresse : https://theses.insa-lyon.fr/publication/2025ISAL0089/these.pdf © [H. Terrasson], [2025], INSA Lyon, tous droits réservés

Introduction

Aphids are major crop pests, causing global losses estimated at hundreds of millions of dollars each year (Gula 2023). They make up to 26% of pests on important food crops in temperate regions, including maize, wheat, potatoes, sugar beets, barleys, and tomatoes (Calevro et al. 2019; Dedryver et al. 2010). These hemipteran insects feed on plant phloem sap, causing physiological stress that hampers plant growth and leads to yield losses (Rabbinge et al. 1981; Dedryver et al. 2010; El Fakhouri et al. 2021; Luo et al. 2022). Aphids have also been reported as the most efficient and important vectors of plant viruses, transmitting nearly 300 different virus species (Hogenhout et al. 2008), which corresponds to 30% of the total number of plant pathogenic viruses identified to date.

Aphids'ecological success is largely due to their symbiotic relationship with the γ-proteobacterium *Buchnera aphidicola*, an obligate 'primary' endosymbiont that provides them with essential nutrients poorly represented in their diet (Wernegreen 2012; Hansen & Moran 2014). This primary symbiont is vertically transmitted and lives within specialized host cells known as bacteriocytes (Baumann 2005) that are the interface of metabolic exchanges between the symbiotic partners (Smith & Moran 2020), regulate symbiont populations (Simonet et al. 2018) and are involved in their vertical transmission (Koga et al. 2012). Aphids can also host various facultative 'secondary' endosymbionts, including *Spiroplasma*, *Wolbachia*, *and Rickettsia* species, as well as Enterobacteria such as *Regiella insecticola*, *Hamiltonella defensa*, and *Serratia symbiotica* (Oliver et al. 2010; Guo et al. 2017). These secondary symbionts, located in the hemolymph, secondary bacteriocytes, and/or other organs (sheath cells, oenocytes, and digestive tract) (Tsuchida et al. 2014), can be transmitted both vertically and horizontally (Darby & Douglas 2003; Li et al. 2018; Pons et al. 2019a, b; Renoz et al. 2019). They have been associated with benefits like thermal resistance (Montllor et al. 2002), protection against natural enemies (Oliver et al. 2003; Scarborough et al. 2005; Frago et al. 2017), and adaptation to different host plants (Renoz 2024; Tsuchida et al. 2004).

Current aphid control strategies rely essentially on chemical treatments, whose extensive use contributes to environmental pollution and the development of insect resistances (Goulson 2018). Consequently, there is an urgent need for the development of environmentally-friendly alternatives. Small disulfide-rich proteins (DRPs) from plants or arthropods are promising candidates to be used instead of, or in combination with low doses of, chemical insecticides, due to their wide range of biological activities related to host defense, as well as their stability and resistance to enzymatic degradation (Ho et al. 2023).

A specific class of DRPs, known as bacteriocyte-specific cysteine-rich (BCR) peptides, has been identified in the pea aphid, *Acyrthosiphon pisum* (Shigenobu & Stern 2013). These peptides, encoded by seven orphan genes, are expressed in the bacteriocytes of both embryonic and adult aphids, suggesting a role in the maintenance of bacteriocyte homeostasis and the control of endosymbionts (Shigenobu & Stern 2013). Previous research has shown that BCR4, in particular, exhibits insecticidal effects when orally delivered to the *A. pisum* line LL01, reducing its survival and mass (Loth et al. 2022).

This investigation aimed to determine what the developmental and anatomical bases of BCR4 toxicity are, whether this toxicity could be explained by a direct effect on symbiotic cells, and whether those vary depending on the aphid genetic background and/or the presence of facultative symbionts. The effects of ingesting sublethal doses of BCR4 were investigated using a panel of complementary approaches (life history traits, histological and FISH analyses, and flow cytometry) applied to three *A. pisum* lines: LL01, YR2-amp, and YR2-*Ri*. LL01 and YR2 lines are genetically different. Moreover, the first two lines only harbor the obligate symbiont *B. aphidicola*, while the third also hosts the facultative symbiont *R. insecticola.*

Material and methods

Aphid lines and rearing

All the experiments were performed using the pea aphid, *Acyrthosiphon pisum*. Three distinct lines were used: LL01, YR2-*Ri*, and YR2-Amp. LL01 corresponds to a natural line (Rahbé & Febvay 1993) harboring only the obligate primary symbiont *B. aphidicola*. YR2-*Ri* naturally harbors both *B. aphidicola* and the facultative symbiont *R. insecticola* (Simon et al. 2011). YR2-Amp was produced from the YR2-*Ri* line, after treatment with antibiotics to eliminate *R. insecticola* (Koga et al. 2007; Simon et al. 2011). The presence of the latter and the absence of other secondary symbionts that may be found in pea aphids (*i.e., Hamiltonella defensa*, *cd. Fukatsuia symbiotica*, *Rickettsia* sp, *Rickettsiella* sp, *Serratia symbiotica* and *Spiroplasma* sp.) were verified by a PCR-based diagnostic developed by Peccoud et al. (2014). The three lines were maintained as strictly parthenogenetic matrilines on young broad bean plants (*Vicia faba*, L. cv. Aquadulce), with a photoperiod of 16 h light-8 h dark, at 21 °C with ~60% of humidity. To obtain synchronized aphids, around 100 reproductive females (9–11-day- old) per line were left on plants for 24–72 h (pre-synchronization). The adults were then removed, and newborn nymphs were kept on the plant for 9 days (= adult stage), then transferred to a new plant for

Thèse accessible à l'adresse : https://theses.insa-lyon.fr/publication/2025ISAL0089/these.pdf © [H. Terrasson], [2025], INSA Lyon, tous droits réservés

24 h (synchronization). The resulting synchronized first instar nymph (< 1 day old) were then placed on artificial diets containing different concentrations of the BCR4 peptide for the different experiments. The complete experimental design is illustrated in Fig. S1.

Synthesis and purification of BCR4

The BCR4 peptide sequence was synthesized and folded according to the optimized procedure described in a previous study (Loth et al. 2022). Briefly, BCR4 was generated by native chemical ligation (NCL) of two peptide segments, followed by oxidative folding to form the three disulfide bridges. Both peptide segments were purified using C18 reverse phase (RP) HPLC. The purified peptides were then chemoselectively coupled and purified under standard NCL conditions to yield the pure reduced form of BCR4. This form was then subjected to in vitro oxidative folding followed by purification to homogeneity using C18 RP-HPLC. Analysis of the final folded product by ESI-HRMS confirmed the presence of three disulfide bridges.

Survival and growth monitoring following BCR4 ingestion

To test the effect of BCR4 ingestion on aphid survival and growth, the synthetic peptide was serially diluted in AP3 artificial diet (Rahbé et al. 1988; Calatayud 2000) at the following concentrations (in µg/ml): 0 (control), 50, 100, 250, 375, 500, 750 and 1000, and prepared in ad hoc feeding chamber as previously described (Rahbé et al. 1988). For each aphid line and each concentration, three groups of ten first instar nymphs were collected and fed on independent feeding chambers. In order to avoid contamination, the artificial diet was replaced on the fourth day of treatment. Moreover, to avoid crowding of the feeding chamber, aphids were split into two groups of five aphids (Fig. S1). Survival was monitored daily for seven days. At the end of the experiment, all surviving aphids in the control groups had reached the fourth nymphal stage and ten surviving aphids per group were randomly selected and individually weighed on a Mettler AE163 analytical microbalance (Mettler Toledo, Columbus, OH, United States). To confirm the specificity of the observed effect, i.e. that this was due to BCR4, the same experimental design was repeated, using a negative control peptide at the highest concentration only (1000 µg/ml). The peptide used (U_{11}; for details, see Barassé et al. 2023) comes from the ant *Tetramorium bicarinatum*, possesses a disulfide bond and a molecular weight of 4.0 kDa, close to the 5.9 kDa of BCR4.

Analysis of the effect of BCR4 ingestion on aphid morphology and anatomy

To study the effect of BCR4 ingestion on aphid morphology and anatomy, the previous experimental design was repeated with aphids fed either on a control AP3 diet or on a diet supplemented with the dose of 1000 µg/ml of BCR4 for 7 days. At this time, all aphids in the control groups had reached the fourth nymphal stage. Dissection and histological preparations were carried out as described below.

Dissection and macroscopic observations

After 7 days of treatment, at least six aphids per condition and per line were randomly selected, and photographed with a Moticam S6 camera (MoticEurope, Barcelona, Spain) attached to a Leica MZ FLIII stereomicroscope (Leica Microsystems, Wetzkar, Germany) to compare their size, shape and color. They were then dissected in isoosmotic buffer A (0.025 M KCl, 0.01 M MgCl2, 0.25 M Sucrose, and 0.035 M Tris–HCl, pH 7.5) by opening the abdomen with microdissection tweezers (Dumont type 5 Dumoxel; Electron Microscopy Science, Hatfield, UK) as previously described (Ribeiro Lopes et al. 2021). The digestive tract and the embryonic chains were isolated and photographed using the same camera.

Aphid section preparation

For histological staining and FISH (Fluorescent In-Situ Hybridization) of treated and control aphids, four individuals per condition were randomly selected after 7 days of treatment, and sections were prepared as previously described (Ribeiro Lopes et al. 2022). Briefly, antennae and legs were removed from aphids with microdissection tweezers, before immersing them in a solution of PBS containing 4% paraformaldehyde and 0.1% Triton X-100 at 4 °C for 24 h. Aphids were then transferred to a solution of PBS with 4% paraformaldehyde. After several washing steps in PBS, aphids were embedded in 1.3% agar. The resulting samples were dehydrated through a series of ethanol solutions ranging from 70 to 100%, and transferred in 1-butanol at 4 °C for at least 24 h. In order to prepare aphid sections, aphids were embedded in Paraplast/1-butanol (v/v) for 10 h and then in 100% Paraplast (Paraffine Paraplast Plus Mc Cormick Scientific Dutscher). Resulting Paraplast blocks were sectioned at 3 µm thickness using a HM340E rotary microtome (ThermoScientific, Waltham, MA, United States). Sections were positioned on polylysine coated slides and conserved at 4 °C until staining.

Thèse accessible à l'adresse : https://theses.insa-lyon.fr/publication/2025ISAL0089/these.pdf © [H. Terrasson], [2025], INSA Lyon, tous droits réservés

Histological preparation and observation

Sections were prepared for Hematoxylin and Eosin (H&E) staining with RAL products (RAL Diagnostics, Martillac, France) using a protocol adapted from Sapountzis et al. (2014). Briefly, sections were deparaffinated in methylcyclohexane (2 × 10 min) and rehydrated through an ethanol series to PBS. Nucleus and cytoplasm were stained in Mayer Hematoxylin for 3 min and Eosin for 2 min, respectively, with a water rinse in between. Sections were then washed in water and treated through an ethanol series from 70 to 100%. After a rapid bath in Diasolv (Diapath, Martinengo, Italia) solution, sections were mounted with Diamount mounting medium (Diapath, Martinengo, Italia). Histological observation was performed under transmitted light, on a Thunder Imager 3D Live Cell™ microscope (Leica, Wetzlar, Germany) with 4X or 20X magnification.

FISH analysis

FISH procedure was adapted from Simonet et al. (2018). Sections were deparaffinated using methylcyclohexane (2 × 10 min), followed by two 10 min baths in 100% ethanol, and then air-dried. Deproteinization was conducted with 0.01 M hydrochloric acid and 10 mg/mL pepsin at 37 °C for 10 min. Sections were rinsed in PBS and dehydrated through a series of ethanol solutions ranging from 70 to 100%. Prehybridization took place at 45 °C for 30 min in a prehybridization buffer consisting of 79% hybridization buffer (0.9 M NaCl, 20 mM Tris, 5 mM EDTA, pH 7.2), 20% Denhardt's solution (5 g Ficoll, 5 g polyvinylpyrrolidone, 5 g BSA in 500 mL water), and 1% SDS solution (10% SDS). In situ hybridization was performed by incubating the slides at 45 °C for 3 h, shielded from light, with 5 µl of 100 µM oligonucleotide probes specifically targeting *B. aphidicola* and *R. insecticola* 16S rRNAs (Table S1). Probes were prepared in prehybridization buffer and their 5'end was labeled with Alexa Fluor 488 and Alexa Fluor 594, respectively. Sections were washed twice in washing solution (99% hybridization buffer and 1% SDS 10%), rinsed in PBS and finally mounted using PermaFluor Aqueous Mounting Medium (Thermo Fisher Scientific) containing DAPI (3 µg/mL; Vector Laboratories). Positive fluorescent signals were analyzed using a Thunder Imager 3D Live Cell™ microscope (Leica) equipped with the appropriate emission filters.

Analysis of the effect of BCR4 ingestion on aphid symbiont

The BCR4 bioassay experiment was repeated with only aphids fed either a control AP3 diet or a diet supplemented with of 1000 µg/µl BCR4 for 7 days. To assess the impact of the treatment on the quantity of the primary symbiont *B. aphidicola* and the secondary symbiont *R. insecticola,* a flow cytometry approach, that proved to be effective to obtain the absolute numbers of bacteria in this model, was used (Simonet et al. 2016).

For each condition, symbiotic bacteria from 12 whole aphids were purified as previously described (Simonet et al. 2016). Aphids were gently crushed with a Potter homogenizer in 3 ml of ice-cold buffer A and the homogenate was consecutively filtered through nylon net filters with 60, 30 and 10 µm pore sizes (Merck Millipore, Tullagreen, Ireland). Following centrifugation (4,000 × g, 5 min, 4 °C), the pellet of endosymbiotic bacteria was re-suspended in 200 µl, for aphids reared on AP3 + BCR4 (1000 µg/ml) medium, or 400 µl, for aphids reared on AP3, of NaCl 0.85% supplemented with 20% glycerol as a cryoprotective agent, and stored at − 80 °C until flow cytometry analysis. Immediately prior to flow cytometry analyses, samples were thawed for 3 min at 42 °C, vortexed and diluted to 1:20 with a NaCl 0.85% solution to reach the optimal cell concentration for flow cytometry analysis (< 2,000 events/sec). All solutions were filter-sterilized at 0.22 µm prior to use to avoid contamination with exogenous bacteria. For bacterial staining, 0.5 µl of the nucleic acid probe SYTO9 (3.34 mm; Molecular Probes Inc, Eugene, OR, USA) was added to 300 µl of the diluted bacterial suspensions. The mixture was then vortexed and incubated in the dark for 15 min at room temperature, following the manufacturer's instructions. The stained samples were analyzed using a BD Accuri™ C6 flow cytometer (BD Biosciences, Franklin Lakes, NJ, USA) equipped with a blue laser (488 nm, air-cooled, 20 mW solid state) and cell green fluorescence was acquired with a photomultiplier tube detector and a 530 nm band-pass filter (503–563 nm). Flow cytometry measurements were run at low flow rate (14 µl/min) and the core stream was allowed to stabilize for 30 s prior to the 2 min acquisition. Data were collected and processed using BD Accuri C6 software (version 1.0.264.21, BD Biosciences). The analyses were performed using logarithmic gains and specific detector settings, adjusted on non-stained samples to eliminate endosymbiont autofluorescence. Then, the endosymbiont population was identified by screening samples on FSC-W versus FSC-H (Forward Scatter Width vs. Height) and SSC-W versus SSC-H (Side Scatter Width vs. Height) dot plots. *B. aphidicola* populations were identified using the same parameter than previously described (Simonet et al. 2016). A second population of SYTO9-positive event, of different size and granularity, was identified in YR2-*Ri* samples and used to count *R. insecticola* symbionts (Fig. S2). For each condition, four biological replicates were processed.

Thèse accessible à l'adresse : https://theses.insa-lyon.fr/publication/2025ISAL0089/these.pdf © [H. Terrasson], [2025], INSA Lyon, tous droits réservés

Statistical analysis

Statistical analysis and graphical representations were conducted using the R software (v4.3.1) (R Core Team 2023). R packages « survival» and « survminer» (Therneau 2024) were used to analyze survival data, comparing curves with a Wilcoxon-Gehan rank test. To estimate the lethal time taken for 20% of the aphid population to die (LT_{20}) when fed on artificial diet containing 1000 µg/µl of BCR4, generalized linear models (glm) with a probit link transformation were fitted for each aphid line and compared with a ratio test, using the R package "ecotox" (Hlina et al. 2021). Dose–response curves of the effect of BCR4 ingestion on aphid mass were fitted with the « drc» package (Ritz et al. 2015) using a log-logistic model with three parameters (with the lowest limit fixed to 0) and box-cox transformation, allowing to predict 95% confidence intervals (CI_{95}%) and the effective dose that affect 50% of the mass compared to control (ED_{50}).

For the flow cytometry analyses, the absolute numbers of symbionts obtained for each aphid pool were converted into "symbiont numbers per aphid". A linear regression model was applied on data. Pairwise comparisons were performed to investigate significant differences between modalities using the eammeans function of the R package "emmeans".

Results

BCR4 treatment reduces survival and mass of three aphid lines

The dose–response effect of BCR4 ingestion on survival was first compared between the three aphid lines LL01, YR2-amp, and YR2-*Ri*. In the absence of BCR4, the three lines show comparable survival rates on the artificial diet, with a 7-day survival of 93%, 97%, and 97% for LL01, YR2-amp, and YR2-*Ri*, respectively. Survival of LL01 and YR2-amp lines is significantly affected by BCR4 ingestion (log-rank test: $p < 0.001$), but not that of YR2-*Ri* (log-rank test: $p = 0.113$) (Fig. 1). However, both YR2 lines survive better than the LL01 line (log-rank test LL01 vs YR2-amp or YR2-*Ri*: $p < 0.001$). Similar results were obtained when focusing solely on the treatment with the highest concentration of BCR4 (1000 µg/µl): (i) the 7-day survival is of 77% and 83% for YR2-amp and YR2-*Ri*, respectively, and only 50% for LL01; (ii) the estimated time to reach 20% of the mortality

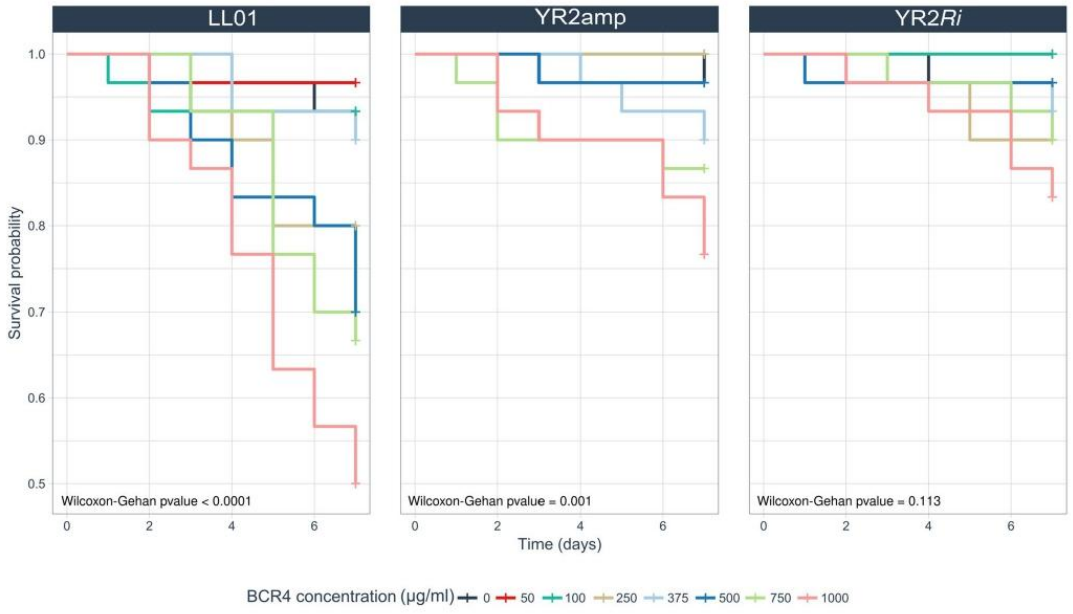


Fig. 1 Dose–response effect of BCR4 ingestion on survival of three *Acyrthosiphon pisum* lines. Survival curves of aphid fed on artificial diets (AP3) containing different concentrations of BCR4 peptide during 7 days. Left, central, and right panels correspond to survival curves of LL01, YR2-amp, and YR2-*Ri* lines, respectively. $n = 30$ for each BCR4- oncentration group for each line. Data were analyzed using the Wilcoxon–Gehan Test

Thèse accessible à l'adresse : https://theses.insa-lyon.fr/publication/2025ISAL0089/these.pdf © [H. Terrasson], [2025], INSA Lyon, tous droits réservés

(LT_{20}) for LL01 (3.5 days) is significantly different from the LT_{20} of both YR2-amp (6.8 days; ratio test: $p = 0.002$) and YR2-*Ri* (8,6 days; ratio test: $p < 0.001$). In contrast, no mortality was observed in aphids fed with 1000 µg/ml of U11 peptide (Fig. S3).

The results show that there is a dose–response effect of BCR4 on the mass of each line (lack-of-fit test: $p < 0.05$; Fig. 2a). Feeding on BCR4 has a significant, negative impact on aphids' mass, with an average reduction of 78%, 65%, and 75% for LL01, YR2-amp, and YR2-*Ri*, respectively, compared to the control. The BCR4 concentration that would cause a 50% reduction in aphid mass (ED_{50}) was predicted, revealing a more potent effect on the LL01 line ($ED_{50} \pm$ SD of 383.8 ± 39.6 µg/ml; 535.3 ± 75.6 µg/ml; and 445.2 µg/ml ± 52.1 for LL01, YR2-amp, and YR2-*Ri*, respectively). Discoloration of the aphid cuticle is also observed for each line, with a more noticeable effect on YR2-amp and -*Ri* compared to LL01 probably due to their more contrasted color (Fig. 2b–d).

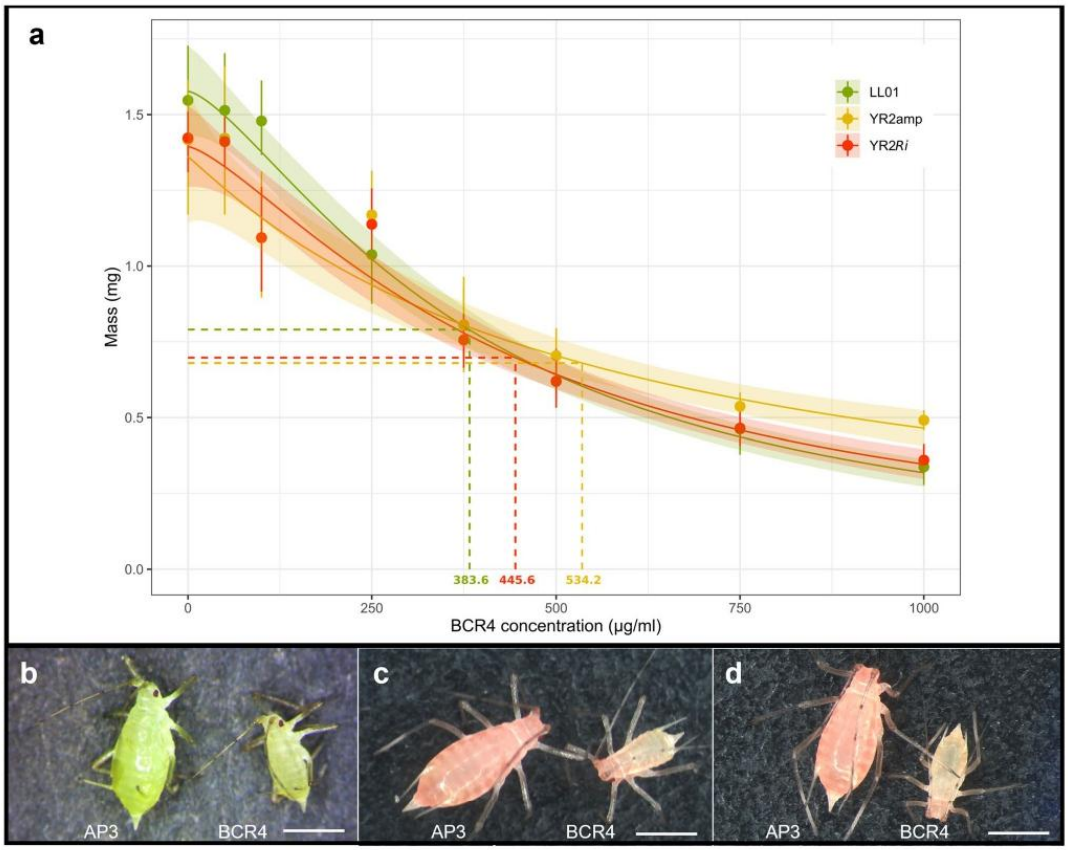


Fig. 2 Effect of BCR4 ingestion on fresh mass, size, and body color of three *Acyrthosiphon pisum* lines. **a** Dose-reponse curves of aphids' mass following 7 days of feeding on artificial diets containing different concentrations of BCR4 peptide. Results for the LL01 line, YR2-amp line, and YR2-*Ri* line, are presented in green, yellow, and red, respectively. For each BCR4 concentration, dots with error bar correspond to mean mass with standard deviation. For each line, dose response effect of BCR4 ingestion was modeled with a log-logistic model with three parameters followed by box-cox transformation and displayed with its predicted confidence interval. Dash lines correspond to the estimated BCR4 concentration that leads to a 50% reduction in mass compared with aphids fed on AP3 medium without BCR4 (ED50). $n = 10$ aphids for each BCR4 concentration group for each line. **b–d** Pictures of seven-day-old aphids fed on artificial diets (AP3) complemented or not with 1000 µg/ml of BCR4 during 7 days. Panels b, c, and d correspond to the LL01 line, YR2-amp line, and YR2-*Ri* line, respectively. Scale bar: 1 mm

Thèse accessible à l'adresse : https://theses.insa-lyon.fr/publication/2025ISAL0089/these.pdf © [H. Terrasson], [2025], INSA Lyon, tous droits réservés

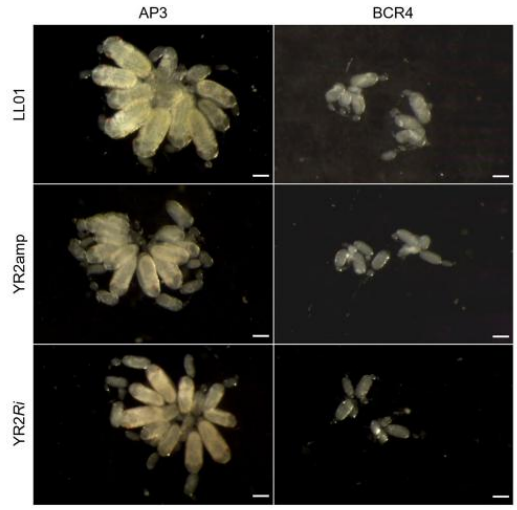


Fig. 3 Effect of BCR4 ingestion on dissected embryonic chain in the three *Acyrthosiphon pisum* lines**.** Left panels correspond to embryonic chains dissected from LL01, YR2-amp and YR2-*Ri* lines fed on AP3 medium (control) for 7 days. Right panels correspond to embryonic chains dissected from LL01, YR2-amp, and YR2-*Ri* fed on BCR4 diluted in AP3 medium (treated) for 7 days. Scalebar: 200 µm

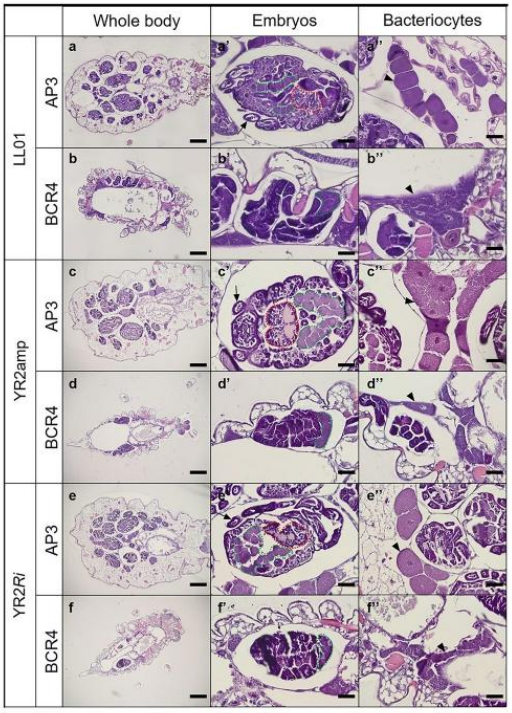


Fig. 4 Effect of BCR4 ingestion on embryos and bacteriocytes in three *Acyrthosiphon pisum* lines. **a–f** H&E staining of 7-day-old aphids belonging to the LL01, YR2-amp, and YR2-*Ri Acyrthosiphon pisum* lines fed on artificial diets (AP3) complemented or not with 1000 µg/ml of BCR4 during 7 days. **a'–f'** Higher magnification of embryos. The green- and red-dotted lines surround the bacteriocytes and the central nervous system of embryos, respectively. The black arrows indicate a visible limb (antenna or leg). **a''–f''** Higher magnification of maternal bacteriocytes indicated by the black arrowheads. Scalebars: 100 µm in *a-f*, 20 µm in *a'-f'*, 20 µm in *a''-f''*

Impact of BCR4 on the anatomy of aphids and their embryos

To assess whether the reduction in mass following BCR4 treatment was accompanied by changes in aphid tissue organization, dissections, histological and FISH analyses of individuals treated with the highest concentration of BCR4 were carried out.

Macroscopic observations

Macroscopic observations of dissected aphids revealed no obvious differences between the digestive tracts of control and treated individuals. No signs of fragility were observed during dissection, and the different regions of the digestive tract (foregut, midgut, hindgut) were clearly identifiable and appeared intact in both aphid groups (Fig. S4). However, significant differences were observed in the development of embryonic chains (Fig. 3). In control aphids, the classic two ovaries, each containing seven ovarioles, are clearly visible. These ovarioles consist of chains of embryos at different developmental stages. In these aphids, the most developed embryos exceed 500 µm in length and are pigmented. The pair of red eyes and the beginning of thorax segmentation are also visible (Fig. 3). In contrast, the embryonic chains of treated individuals are more crumbly and fragile. They contain fewer and smaller embryos, with the largest ones reaching only 300 µm. In addition, no coloration, no eyes, and no segmentation is noticeable, regardless of the aphid line (Fig. 3).

Histological analysis with hemalum and eosin staining

Histological analyses confirmed the macroscopic observations. Specifically, H&E staining reveals no evidence of epithelial cell degradation in the digestive tract following the treatment (Fig. 4d or f). On the other hand, an adverse effect of BCR4 on aphid development is clearly visible. In particular, numerous well-developed embryos with a developed central nervous system (CNS) and visible limbs (Fig. 4 a', c', e') can be distinguished in sections from control aphids. Bacteriocytes are cellularized and form two

Thèse accessible à l'adresse : https://theses.insa-lyon.fr/publication/2025ISAL0089/these.pdf © [H. Terrasson], [2025], INSA Lyon, tous droits réservés

lobes located in proximity to the developing digestive tract. While embryos are still visible in treated aphids, they are negatively impacted by the treatment: their organs are indistinguishable and the bacteriocytes, though present, appear acellularized, with no apparent cell membrane (Fig. 4 b', d', e'). In all the embryos that could be observed, the bacteriocyte mass is found at the posterior pole, which suggests that these embryos are undergoing a developmental delay.

BCR4 ingestion also shows a strong effect on the morphology of the mother's bacteriocytes (Fig. 4 a"–f"). Although the symbiotic cells are present in both control and treated aphids, bacteriocytes from the latter are deformed, appearing crushed between organs, and sometimes difficult to distinguish from each other (Fig. 4b", d", e"). In addition, observation of whole-insect sections suggests a reduction in bacteriocyte number (Fig. 4a-f).

FISH analyses

FISH analyses were carried out to assess the effect of BCR4 on symbiont localization and the structure of bacteriocytes. Observation of control aphids (reared on AP3 artificial diet) shows that the localization of *B. aphidicola* and *R. insecticola* is the same as previously described in other aphid lines (Moran et al. 2005; Tsuchida et al. 2005): *B. aphidicola* is exclusively found in maternal and embryonic bacteriocytes (Fig. 5a-c), while *R. insecticola* is observed extracellularly, in the hemolymph and around the bacteriocytes, and intracellularly, in sheath cells attached to the bacteriocytes, resulting in a signal that completely surrounds the bacteriocyte clusters (Fig. 5c).

After BCR4 treatment, the localization of the primary symbiont is not affected, and it is strictly confined to maternal and embryonic bacteriocytes. Nevertheless, consistent with H&E observations, maternal bacteriocytes appear deformed and less numerous (Fig. 5a'–c'). Moreover, in embryos, bacteriocytes appear to be packed in the posterior region, in contrast to their classical localization around the digestive tract (Fig. 5d–f). Regarding *R. insecticola*, the signal is also detected in treated aphids at the same localization as in the control (Fig. 5f). However, a reduced signal is observed in the hemolymph and around the bacteriocytes and the signal surrounding the bacteriocyte clusters is not continuous as in the controls (Fig. 5c and f).

BCR4 significantly reduces symbiont populations

To assess whether the observed effect of BCR4 ingestion on bacteriocyte morphology and numbers translates into a change in the density of symbiont populations, a flow cytometry analysis using a single-cell counter cytometer was performed to determine the absolute number of symbionts per aphid (Simonet et al. 2016). The mean total number of

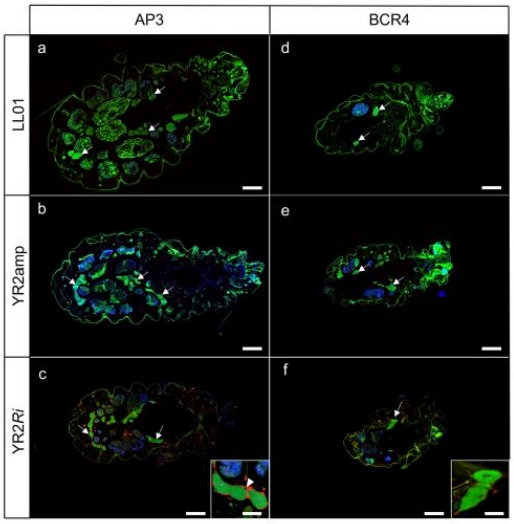


Fig. 5 Effect of BCR4 treatment on symbiont localization. FISH observation of 7-day-old aphids belonging to the LL01, YR2-amp, and YR2-*Ri Acyrthosiphon pisum* lines fed on artificial diets (AP3) only (**a–c**) or complemented with 1000 µg/ml of BCR4 during seven days (**d–f**). *Buchnera aphidicola* is labeled in green and *Regiella insecticola* in red, respectively. Maternal bacteriocytes are indicated with white arrows. In YR2-*Ri* individuals (**c**, **f**) higher magnification shows maternal bacteriocytes filled with *B. aphidicola* and surrounded by *R. insecticola*. White arrowhead indicates *R. insecticola* signal in a sheath cell. Scale: 200 µm and 50 µm for whole body images and zoom on bacteriocytes, respectively

events corresponding to *B. aphidicola* decreases drastically from 1.07×10^6 to 1.48×10^5 for LL01, from 6.67×10^5 to 1.82×10^5 for YR2-amp, and from 7.04×10^5 to 1.10×10^5 for YR2-*Ri*. This corresponds to reductions of 86%, 73%, and 84%, respectively. The BCR4 treatment ($F_{1,17} = 120.172$, $p < 0.001$) and the interaction between line and treatment ($F_{2,17} = 4.224$, $p = 0.03$) significantly impact *B. aphidicola* count while the line alone do not ($F_{2,17} = 3.327$, $p = 0.06$). The mean total number of events corresponding to *R. insecticola* in YR2-*Ri* line decreases more modestly, from 1.79×10^6 to 7.57×10^5, a significant reduction of 58% ($F_{1,5} = 50.336$, $p < 0.001$) (Fig. 6).

Discussion

This study investigated the impact of BCR4 peptide ingestion on three *A. pisum* lines, LL01, YR2-amp, and YR2-*Ri*, differing in their genetic background (LL01 or YR2) and by the absence (LL01 and YR2-amp) or presence (YR2-*Ri*) of the secondary symbiont *R. insecticola*. Overall, we showed an insecticidal effect of BCR4, with a strong impact

Thèse accessible à l'adresse : https://theses.insa-lyon.fr/publication/2025ISAL0089/these.pdf © [H. Terrasson], [2025], INSA Lyon, tous droits réservés

on survival, fresh weight, embryo development, bacteriocyte morphology, and symbiont numbers.

Our findings corroborate previous results obtained by Loth et al. (2022), which showed a dose–response effect of BCR4 on aphid survival and weight. However, the latter study was carried out on a single genetic line (LL01), carrying only the primary symbiont *B. aphidicola*, whereas several works have shown a significant impact of the genotype on aphid response to biotic stresses, such as host plant changes (Ferrari et al. 2007), parasitoid wasp attacks (Libbrecht et al. 2007; Martinez et al. 2018), or temperature increase (Jahan et al. 2023), highlighting the importance of considering different genetic lines. In the present study, we showed a contrasting effect of BCR4 on aphids' survival depending on their genetic background: at equivalent concentration, LL01 individuals died faster and to a greater extent than YR2-amp and YR2-Ri. Similarly, BCR4 ingestion reduced aphid mass in a dose-dependent manner, with the LL01 line being the most affected. While the insecticidal mode of action of BCR4 is unknown to date, our findings on the impact of BCR4 on aphid survival are similar to previous results following the use of other known antimicrobial peptides on aphids. Indeed, ingestion of indolicidin (an AMP produced by bovine neutrophils) reduces the survival of *Myzus persicae* (Le-Feuvre et al. 2007) and Luna-Ramirez et al. (2017) showed that ingestion of certain scorpion AMPs exerts insecticidal activity against *A. pisum*.

Presence of *R. insecticola* had no impact on *A. pisum* survival, however, the symbiont aggravated the negative impact of BCR4 on aphid weight. Secondary symbionts have been reported to positively or negatively affect aphids' fitness, depending on the environment or the stress to which the insect is subjected, including xenobiotic exposure (Lemoine et al. 2020; Zytynska et al. 2021). For instance, infection by *Serriatia symbiotica* in *A. pisum* (Skaljac et al. 2018) and *Rickettsia* in the whitefly *Bemisia tabaci* (Kontsedalov et al. 2008), is associated with increased susceptibility to chemical insecticides, while the infection by *Hamiltonella defensa* is associated with reduced susceptibility in the aphid *Sitobion miscanthi* (Li et al. 2021). In *A. pisum*, infection by *R. insecticola* is associated with reduced aphid survival during heat stress (Russel and Moran, 2005) or bacterial infection (Luo et al. 2021). Conversely, the symbiont confers protection against fungal (Scarborough et al. 2005; Parker et al. 2013, 2017) or viral infections (Higashi et al. 2023), indicating that the bacterium could contribute to host defenses in different ways. Although symbionts have been reported to increase their hosts' sensitivity to insecticides (Kontsedalov et al. 2008; Skaljac et al. 2018), the underlying mechanisms remain unknown. Hosting secondary symbionts is a finely-tuned cost–benefit trade-off for aphids, as symbionts are associated with a permanent physiological cost, acting as sinks for metabolites (Zytynska et al. 2021). Harboring the *R. insecticola* symbiont has been shown to negatively impact the host fitness (Sochard et al. 2021; Man et al. 2023). Here, the cost of hosting *R. insecticola* may be exacerbated when *A. pisum* experiences stressful conditions such as exposure to BCR4. Similarly, specific symbiont combinations may aggravate the whitefly *B. tabaci* performance on unfavorable host plants (Benhamou et al. 2021).

The negative impact of BCR4 on survival and weight of *A. pisum* could be direct, by affecting aphid cells, or indirect, by targeting symbionts and disrupting the obligate nutritional relationship between the insect and its symbiotic bacteria. Concerning the direct cytotoxic effect of BCR4 on aphid cells, it is important to underline that this could not be excluded, as it has been shown that high concentration of certain AMPs could exert a cytotoxic activity, in vitro, against mammalian cells, by disrupting cell membranes (Vaucher et al. 2010; Greco et al. 2020). Moreover, eukaryotic cells are generally resistant to AMPs. Contrary to prokaryotes, eukaryotic cell membranes contain sterol and mainly zwitteronic phospholipids that stabilize the membrane and confer a protection against AMPs (Mason et al. 2007; Anderson et al. 2016; Almeida et al. 2021). Nevertheless, Greco et al. 2020 have shown that, when inoculated in rats, AMPs lose their cytotoxic potential.

To gain an in-depth understanding of the effects of BCR4 ingestion on aphids and their symbionts, dissection and histological observations were performed. These analyses revealed a similar and significant negative effect on the embryos of each aphid line. Following treatment, embryonic chains were more fragile and contained smaller and fewer embryos, for which it was impossible to distinguish appendages or organs on histological sections. Histological and FISH observations revealed that the bacteriocytes and the *B. aphidicola* they contain were mostly grouped at the posterior pole of the embryo, a localization that is usually limited to the early stages of embryo development (Miura et al. 2003; Braendle et al. 2003). Furthermore, embryonic bacteriocytes in treated aphids appeared acellularized, a disposition that is usually observed at the beginning of embryonic development. Taken together, these observations demonstrate a delay in bacteriocytes morphogenesis. Whereas previous studies using indolicidin (Le-Feuvre et al. 2007) or scorpion AMPs (Luna-Ramirez et al. 2017) have shown an adverse impact of these peptides on aphid fecundity, our study presents for the first time a disruption of aphid embryonic development caused by the ingestion of an AMP.

Moreover, analyses of FISH and H&E staining revealed an alteration in maternal bacteriocytes. While bacteriocytes in the control group are numerous and round-shaped, most bacteriocytes from treated aphids appear fewer in number and distorted in the three aphid lines. The effect on aphid bacteriocytes is similar to the one observed by Le-Feuvre et al. (2007) in *M. persicae*, who reported distortion of

Thèse accessible à l'adresse : https://theses.insa-lyon.fr/publication/2025ISAL0089/these.pdf © [H. Terrasson], [2025], INSA Lyon, tous droits réservés

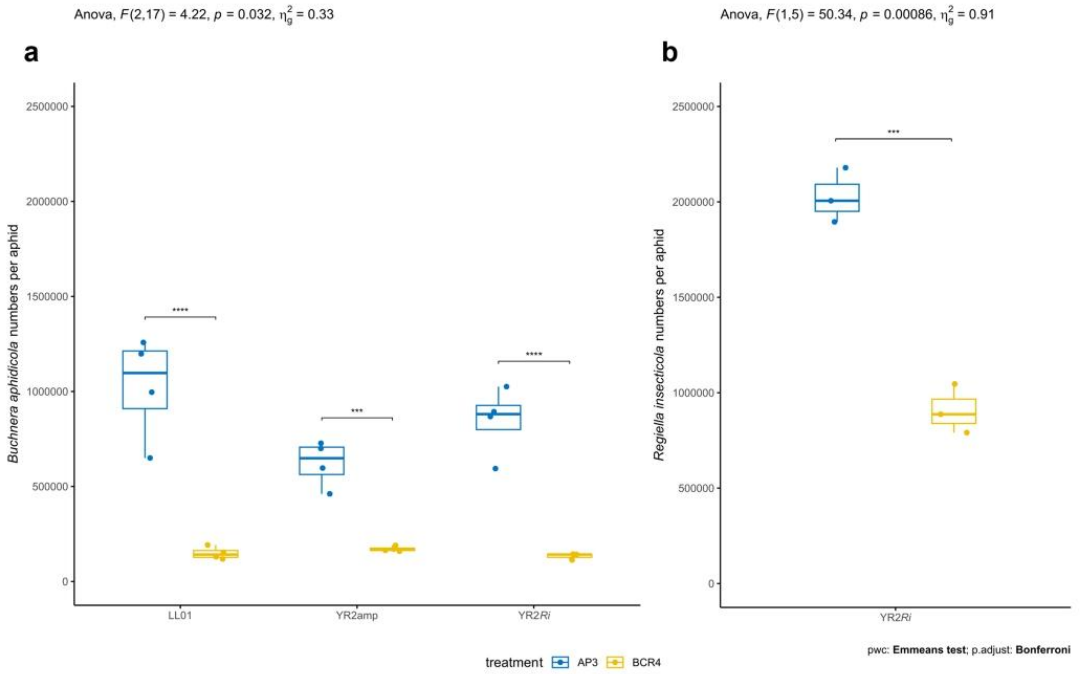


Fig. 6 Effect of BCR4 ingestion on *Buchnera aphidicola* and *Regiella insecticola* numbers in three *Acyrthosiphon pisum* lines. Number of bacteria per aphid fed on AP3 (blue) or in AP3 + BCR4 (1000 µg/ml) (yellow) for **a** *B. aphidicola* from different lines (*i.e.* LL01, YR2-amp, and YR2-*Ri*) and **b** the *R. insecticola* from YR2-*Ri* line. (pwc = pairwise comparison with emmeans test: ****: $p < 0.0001$; ***: $p < 0.001$. $n = 4$ per aphid, per line and per treatment)

bacteriocyte morphology and reduction of bacteriocyte numbers after treatment with indolicidin. Our study shows that BCR4 does not destroy the bacteriocyte membrane at the tested doses. Moreover, no disruption of the digestive tract membranes was observed. Nevertheless, an ultrastructural alteration of the membranes cannot be excluded. Further studies are needed to dissect the precise effect of BCR4 on aphid cell membranes using appropriate approaches such as transmission electron microscopy.

With FISH, we also show that the *R. insecticola* signal appears to be less intense around the bacteriocytes than in the rest of the body.

Taken together, the disturbance in the anatomical organization of bacteriocytes and the reduction of *R. insecticola* signal suggests an effect of BCR4 on both symbiotic populations. To test this hypothesis, we used flow cytometry to get insights into the number of symbiotic bacteria. Comparison between symbiont numbers in YR2-*Ri* lines showed that *R. insecticola* is more than twice as abundant as *B. aphidicola* in both control and treated aphids. This is consistent with a previous study conducted on another parthenogenetic line (LSR1) of *A. pisum* (Goldstein et al. 2023) showing similar relative abundance for certain *R. insecticola* strains. Concerning the treatment with BCR4, flow cytometry showed a massive reduction (72–84%) of *B. aphidicola* numbers in BCR4-treated aphids. This method also showed that BCR4 has a strong, but lower effect (58%) on *R. insecticola* numbers. Comparable results have been obtained by Luna-Ramirez et al. (2017), who showed that ingestion of scorpion AMPs reduces the symbiotic load (*B. aphidicola* and *Serratia symbiotica)* in *A. pisum*, and argue that insecticidal effects of those AMPs are due to a direct effect on symbionts. Importantly, previous studies have shown that BCR4 is bactericidal in vitro against *E. coli*, a Gram-negative bacterium closely related to *B. aphidicola* (Uchi et al. 2019; Loth et al. 2022). Combined with these observations, our results suggest that orally administered BCR4 defensin could have an in vivo bactericidal effect on aphid symbionts in three *A. pisum* parthenogenetic lines, thereby having a negative, indirect impact on their growth, survival, and embryo development.

Interestingly, *B. aphidicola* symbionts appear to be more sensitive to BCR4 than *R. insecticola*. Defensins typically target bacterial membranes, often leading to membrane

Thèse accessible à l'adresse : https://theses.insa-lyon.fr/publication/2025ISAL0089/these.pdf © [H. Terrasson], [2025], INSA Lyon, tous droits réservés

disruption or pore formation (Cociancich et al. 1993; Shai 2002; Wimley 2010; Wu et al. 2018; Agadi et al. 2022) and it has been shown that BCR4 alter *E. coli* morphology and membrane permeability (Uchi et al. 2019). It has been demonstrated that the *B. aphidicola* outer membrane lacks lipopolysaccharides (LPS) (Shigenobu et al. 2000; Charles et al. 2011), which may explain its greater vulnerability compared to *R. insecticola*. As with other AMPs, one could propose that BCR4 exhibits a selective activity, being more specific against one symbiont (here *B. aphidicola*) than another (here *R. insecticola*). For instance, in the bean bug *Riptortus pedestris*, several AMPs called Crypt-specific Cysteine-Rich peptides (CCRs) are expressed in the specialized posterior midgut region M4, prior to the acquisition of orally transmitted microbiota. This results in a selective barrier against unwanted bacteria, which facilitates the colonization by its beneficial symbiont *Caballeronia insecticola* (formerly known as *Burkholderia insecticola*) that is resistant to host CCRs (Lachat et al. 2024). Once established, beneficial *C. insecticola* becomes vulnerable to host AMPs due to an alteration in its LPS, which allows the host to regulate its gut symbionts (Kim et al. 2015). Similarly, in *Drosophila*, AMPs expressed in the gut have been shown to exhibit high selectivity depending on the invading pathogen (Hanson et al. 2019). As an example, the commensal, *Lactiplantibacillus plantarum*, is resistant to host AMPs during infection phases, allowing it to stably colonize the fly gut (Arias-Rojas et al. 2023).

Further investigations are needed to explore the potential of orally administered BCRs in selectively targeting different facultative symbionts in *A. pisum*, and more generally in aphids.

Conclusion

In conclusion, this study highlights the detrimental effect of BCR4 on aphids when administered orally. Further research is needed to understand the functions of the BCR family in aphids and their potential use as bioinsecticides. Targeting insect symbionts in the context of pest management is increasingly being discussed (Arora & Douglas 2017; Gonella et al. 2020; Noman et al. 2020; Sinno et al. 2020; Gonella & Alma 2023; Rupawate et al. 2023). Combined with advances in plant bioengineering (Bisht et al. 2019; Suhag et al. 2021; Mateos Fernández et al. 2022; Komal et al. 2023), and because they are restricted to the aphid lineage (Loth et al. 2022), BCR delivery could be a powerful tool to specifically control aphid pest through interference with their symbiont populations.

Author contributions

M.R.L., F.C. and P.D.S. conceived and designed research. C.J. and G.D. prepared the AP3 medium. C.S. and V.A. produced the BCR4 peptide. H.T., I.R., and C.J. conducted bioassays experiments. H.T. and S.B. performed the survival and mass monitoring and analyzed the data. H.T., K.G. and G.L. conducted histological preparations and observations. H.T., K.G. and G.L. conducted dissections and macroscopical observations. K.G. and G.L. performed flow cytometry experiments and K.G. analyzed the data. J.C.S. provided both YR2 *A. pisum* lines. H.T. prepared the figures and wrote the first draft F.R., S.B., J.C.S., M.R.L., F.C. and P.D.S. reviewed and corrected the draft. All authors read and approved the manuscript.

Supplementary Information The online version contains supplementary material available at https://doi.org/10.1007/s10340-025-01923-0.

Acknowledgements Authors would like to thank Hubert Charles for his suggestions about statistical analysis, and Aurélie Herbomez for secretarial assistance.

Funding This work was supported by INSA Lyon (Institut National des Sciences Appliquées de Lyon), INRAE (Institut National de Recherche pour l'Agriculture, l'Alimentation et l'Environnement) and the French ANR BIOFAMILY project (ANR-19-CE11-0004).

Data availability No datasets were generated or analyzed during the current study.

Declarations

Conflict of interest The authors have no relevant financial or non-financial interests to disclose.

Ethics approval No international, national, and institutional guidelines for the care and use of animals were needed and followed.

References

Agadi N, Maity A, Jha AK et al (2022) Distinct mode of membrane interaction and disintegration by diverse class of antimicrobial peptides. Biochimica Et Biophysica Acta (BBA)—Biomembranes 1864:184047. https://doi.org/10.1016/j.bbamem.2022.184047

Almeida CV, de Oliveira CFR, dos Santos EL et al (2021) Differential interactions of the antimicrobial peptide, RQ18, with phospholipids and cholesterol modulate its selectivity for microorganism membranes. Biochimica Et Biophys Acta (BBA)–gen Subj 1865:129937. https://doi.org/10.1016/j.bbagen.2021.129937

Andersson DI, Hughes D, Kubicek-Sutherland JZ (2016) Mechanisms and consequences of bacterial resistance to antimicrobial peptides. Drug Resist Updates 26:43–57. https://doi.org/10.1016/j.drup.2016.04.002

Arias-Rojas A, Frahm D, Hurwitz R, et al (2023) Resistance to host antimicrobial peptides mediates resilience of gut commensals during infection and aging in *Drosophila*. Proceedings of the National

Thèse accessible à l'adresse : https://theses.insa-lyon.fr/publication/2025ISAL0089/these.pdf © [H. Terrasson], [2025], INSA Lyon, tous droits réservés

Academy of Sciences 120. https://doi.org/10.1073/pnas.2305649120
Arora AK, Douglas AE (2017) Hype or opportunity? Using microbial symbionts in novel strategies for insect pest control. J Insect Physiol 103:10–17. https://doi.org/10.1016/j.jinsphys.2017.09.011
Barassé V, Jouvensal L, Boy G et al (2023) Discovery of an insect neuroactive helix ring peptide from ant venom. Toxins 15:600. https://doi.org/10.3390/toxins15100600
Baumann P (2005) Biology of bacteriocyte-associated endosymbionts of plant sap-sucking insects. Annu Rev Microbiol 59:155–189. https://doi.org/10.1146/annurev.micro.59.030804.121041
Benhamou S, Rahioui I, Henri H, et al (2021) Cytotype affects the capability of the whitefly *Bemisia tabaci* MED species to feed and oviposit on an unfavorable host plant. mBio 12:e0073021. https://doi.org/10.1128/mBio.00730-21
Bisht DS, Bhatia V, Bhattacharya R (2019) Improving plant-resistance to insect-pests and pathogens: the new opportunities through targeted genome editing. Semin Cell Dev Biol 96:65–76. https://doi.org/10.1016/j.semcdb.2019.04.008
Braendle C, Miura T, Bickel R, et al (2003) Developmental origin and evolution of bacteriocytes in the aphid–*Buchnera* symbiosis. PLOS Biology 1. https://doi.org/10.1371/journal.pbio.0000021
Calatayud P-A (2000) Influence of linamarin and rutin on biological performances of *Phenacoccus manihoti* in artificial diets. Entomol Exp Appl 96:81–86. https://doi.org/10.1046/j.1570-7458.2000.00681.x
Calevro F, Tagu D, Callaerts P (2019) Acyrthosiphon pisum. Trends Genet 35:781–782. https://doi.org/10.1016/j.tig.2019.07.003
Charles H, Balmand S, Lamelas A et al (2011) A genomic reappraisal of symbiotic function in the aphid/*Buchnera* symbiosis: reduced transporter sets and variable membrane organisations. PLoS ONE. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0029096
Cociancich S, Ghazi A, Hetru C et al (1993) Insect defensin, an inducible antibacterial peptide, forms voltage-dependent channels in *Micrococcus luteus*. J Biol Chem 268:19239–19245. https://doi.org/10.1016/S0021-9258(19)36505-6
Darby AC, Douglas AE (2003) Elucidation of the transmission patterns of an insect-borne bacterium. Appl Environ Microbiol 69:4403–4407. https://doi.org/10.1128/AEM.69.8.4403-4407.2003
Dedryver C-A, Le Ralec A, Fabre F (2010) The conflicting relationships between aphids and men: a review of aphid damage and control strategies. CR Biol 333:539–553. https://doi.org/10.1016/j.crvi.2010.03.009
El Fakhouri K, Sabraoui A, Kehel Z, El Bouhssini M (2021) Population dynamics and yield loss assessment for pea aphid, *Acyrthosiphon pisum* (Harris) (Homoptera: Aphididae), on lentil in Morocco. InSects 12:1080. https://doi.org/10.3390/insects12121080
Febvay G, Delobel B, Rahbé Y (1988) Influence of the amino acid balance on the improvement of an artificial diet for a biotype of *Acyrthosiphon pisum* (Homoptera: Aphididae). Can J Zool 66:2449–2453. https://doi.org/10.1139/z88-362
Ferrari J, Scarborough CL, Godfray HCJ (2007) Genetic variation in the effect of a facultative symbiont on host-plant use by pea aphids. Oecologia 153:323–329. https://doi.org/10.1007/s00442-007-0730-2
Frago E, Mala M, Weldegergis BT et al (2017) Symbionts protect aphids from parasitic wasps by attenuating herbivore-induced plant volatiles. Nat Commun 8:1860. https://doi.org/10.1038/s41467-017-01935-0
Goldstein EB, de Anda AY, Henry LM, Parker BJ (2023) Variation in density, immune gene suppression, and coinfection outcomes among strains of the aphid endosymbiont *Regiella insecticola*. Evolution 77:1704–1711. https://doi.org/10.1093/evolut/qpad071
Gonella E, Alma A (2023) The role of symbiont-targeted strategies in the management of Pentatomidae and Tephritidae pests under an integrated vision. Agronomy 13:868. https://doi.org/10.3390/agronomy13030868
Gonella E, Orrù B, Marasco R et al (2020) Disruption of host-symbiont associations for the symbiotic control and management of pentatomid agricultural pests—a review. Front Microbiol 11:547031. https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.547031
Goulson D, 232 signatories (2018) Call to restrict neonicotinoids. Science 360:973–973. https://doi.org/10.1126/science.aau0432
Greco I, Molchanova N, Holmedal E et al (2020) Correlation between hemolytic activity, cytotoxicity and systemic in vivo toxicity of synthetic antimicrobial peptides. Sci Rep 10:13206. https://doi.org/10.1038/s41598-020-69995-9
Gula LT (2023) Researchers helping protect crops from pests. NIFA. https://www.nifa.usda.gov/about-nifa/blogs/researchers-helping-protect-crops-pests. Accessed 26 Jun 2024
Guo J, Hatt S, He K et al (2017) Nine facultative endosymbionts in aphids. A Rev J Asia-Pac Entomol 20:794–801. https://doi.org/10.1016/j.aspen.2017.03.025
Hansen AK, Moran NA (2014) The impact of microbial symbionts on host plant utilization by herbivorous insects. Mol Ecol 23:1473–1496. https://doi.org/10.1111/mec.12421
Hanson MA, Dostálová A, Ceroni C et al (2019) Synergy and remarkable specificity of antimicrobial peptides *in vivo* using a systematic knockout approach. Elife. https://doi.org/10.7554/eLife.44341
Higashi CHV, Nichols WL, Chevignon G et al (2023) An aphid symbiont confers protection against a specialized RNA virus, another increases vulnerability to the same pathogen. Mol Ecol 32:936–950. https://doi.org/10.1111/mec.16801
Hlina BL, Birceanu O, Robinson CS et al (2021) The relationship between thermal physiology and lampricide sensitivity in larval sea lamprey (*Petromyzon marinus*). J Gt Lakes Res 47:S284. https://doi.org/10.1016/j.jglr.2021.10.002
Ho TNT, Turner A, Pham SH et al (2023) Cysteine-rich peptides: from bioactivity to bioinsecticide applications. Toxicon 230:107173. https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2023.107173
Hogenhout SA, Ammar E-D, Whitfield AE, Redinbaugh MG (2008) Insect vector interactions with persistently transmitted viruses. Annu Rev Phytopathol 46:327–359. https://doi.org/10.1146/annurev.phyto.022508.092135
Jahan H, Khudr MS, Arafeh A, Hager R (2023) Exposure to heat stress leads to striking clone-specific nymph deformity in pea aphid. PLOS ONE 18. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0282449
Kim JK, Son DW, Kim C-H et al (2015) Insect gut symbiont susceptibility to host antimicrobial peptides caused by alteration of the bacterial cell envelope. J Biol Chem 290:21042–21053. https://doi.org/10.1074/jbc.M115.651158
Koga R, Tsuchida T, Sakurai M, Fukatsu T (2007) Selective elimination of aphid endosymbionts: effects of antibiotic dose and host genotype, and fitness consequences. FEMS Microbiol Ecol 60:229–239. https://doi.org/10.1111/j.1574-6941.2007.00284.x
Koga R, Meng X-Y, Tsuchida T, Fukatsu T (2012) Cellular mechanism for selective vertical transmission of an obligate insect symbiont at the bacteriocyte–embryo interface. Proc Natl Acad Sci 109:E1230–E1237. https://doi.org/10.1073/pnas.1119212109
Komal J, Desai HR, Samal I et al (2023) Unveiling the genetic symphony: harnessing CRISPR-Cas genome editing for effective insect pest management. Plants 12:3961. https://doi.org/10.3390/plants12233961
Kontsedalov S, Zchori-Fein E, Chiel E et al (2008) The presence of *Rickettsia* is associated with increased susceptibility of *Bemisia tabaci* (Homoptera: Aleyrodidae) to insecticides. Pest Manag Sci 64:789–792. https://doi.org/10.1002/ps.1595
Lachat J, Lextrait G, Jouan R et al (2024) Hundreds of antimicrobial peptides create a selective barrier for insect gut symbionts. Proc Natl Acad Sci 121:71. https://doi.org/10.1073/pnas.2401802121

Thèse accessible à l'adresse : https://theses.insa-lyon.fr/publication/2025ISAL0089/these.pdf © [H. Terrasson], [2025], INSA Lyon, tous droits réservés

Le-Feuvre RR, Ramírez CC, Olea N, Meza-Basso L (2007) Effect of the antimicrobial peptide indolicidin on the green peach aphid *Myzus persicae* (Sulzer). J Appl Entomol 131:71–75. https://doi.org/10.1111/j.1439-0418.2006.01117.x

Lemoine MM, Engl T, Kaltenpoth M (2020) Microbial symbionts expanding or constraining abiotic niche space in insects. Curr Opin Insect Sci 39:14–20. https://doi.org/10.1016/j.cois.2020.01.003

Li Q, Fan J, Sun J et al (2018) Plant-mediated horizontal transmission of *Hamiltonella defensa* in the wheat aphid *Sitobion miscanthi*. J Agric Food Chem 66:13367–13377. https://doi.org/10.1021/acs.jafc.8b04828

Li Q, Sun J, Qin Y et al (2021) Reduced insecticide susceptibility of the wheat aphid after infection by the secondary bacterial symbiont *Hamiltonella defensa*. Pest Manag Sci 77:1936–1944. https://doi.org/10.1002/ps.6221

Libbrecht R, Gwynn DM, Fellowes MDE (2007) *Aphidius ervi* preferentially attacks the green morph of the pea aphid, *Acyrthosiphon pisum*. J Insect Behav 20:25–32. https://doi.org/10.1007/s10905-006-9055-y

Loth K, Parisot N, Paquet F et al (2022) Aphid BCR4 structure and activity uncover a new defensin peptide superfamily. Int J Mol Sci 23:12480. https://doi.org/10.3390/ijms232012480

Luna-Ramirez K, Skaljac M, Grotmann J et al (2017) Orally delivered scorpion antimicrobial peptides exhibit activity against pea aphid (*Acyrthosiphon pisum*) and its bacterial symbionts. Toxins 9:261. https://doi.org/10.3390/toxins9090261

Luo C, Belghazi M, Schmitz A et al (2021) Hosting certain facultative symbionts modulates the phenoloxidase activity and immune response of the pea aphid *Acyrthosiphon pisum*. Insect Sci 28:1780–1799. https://doi.org/10.1111/1744-7917.12888

Luo K, Zhao H, Wang X, Kang Z (2022) Prevalent pest management strategies for grain aphids: opportunities and challenges. Front Plant Sci. https://doi.org/10.3389/fpls.2021.790919

Man Y, Li D, Wang M et al (2023) Indirect and direct interactions between grain aphid and parasitoid in the presence of symbiont *Regiella insecticola*. CABI Agric Biosci 4:59. https://doi.org/10.1186/s43170-023-00202-1

Martinez AJ, Doremus MR, Kraft LJ et al (2018) Multi-modal defences in aphids offer redundant protection and increased costs likely impeding a protective mutualism. J Anim Ecol 87:464–477. https://doi.org/10.1111/1365-2656.12675

Mason AJ, Marquette A, Bechinger B (2007) Zwitterionic phospholipids and sterols modulate antimicrobial peptide-induced membrane destabilization. Biophys J 93:4289–4299. https://doi.org/10.1529/biophysj.107.116681

Mateos Fernández R, Petek M, Gerasymenko I et al (2022) Insect pest management in the age of synthetic biology. Plant Biotechnol J 20:25–36. https://doi.org/10.1111/pbi.13685

Miura T, Braendle C, Shingleton A et al (2003) A comparison of parthenogenetic and sexual embryogenesis of the pea aphid *Acyrthosiphon pisum* (Hemiptera: Aphidoidea). J Exp Zool B Mol Dev Evol 295B:59–81. https://doi.org/10.1002/jez.b.3

Montllor CB, Maxmen A, Purcell AH (2002) Facultative bacterial endosymbionts benefit pea aphids *Acyrthosiphon pisum* under heat stress. Ecol Entomol 27:189–195. https://doi.org/10.1046/j.1365-2311.2002.00393.x

Moran NA, Russell JA, Koga R, Fukatsu T (2005) Evolutionary relationships of three new species of Enterobacteriaceae living as symbionts of aphids and other insects. Appl Environ Microbiol 71:3302–3310. https://doi.org/10.1128/AEM.71.6.3302-3310.2005

Noman MS, Liu L, Bai Z, Li Z (2020) Tephritidae bacterial symbionts: potentials for pest management. Bull Entomol Res 110:1–14. https://doi.org/10.1017/S0007485319000403

Oliver KM, Russell JA, Moran NA, Hunter MS (2003) Facultative bacterial symbionts in aphids confer resistance to parasitic wasps. Proc Natl Acad Sci 100:1803–1807. https://doi.org/10.1073/pnas.0335320100

Oliver KM, Degnan PH, Burke GR, Moran NA (2010) Facultative symbionts in aphids and the horizontal transfer of ecologically important traits. Annu Rev Entomol 55:247–266. https://doi.org/10.1146/annurev-ento-112408-085305

Parker BJ, Spragg CJ, Altincicek B, Gerardo NM (2013) Symbiont-mediated protection against fungal pathogens in pea aphids: A role for pathogen specificity? Appl Environ Microbiol 79:2455–2458. https://doi.org/10.1128/AEM.03193-12

Parker BJ, Hrček J, McLean AHC, Godfray HCJ (2017) Genotype specificity among hosts, pathogens, and beneficial microbes influences the strength of symbiont-mediated protection. Evolution 71:1222–1231. https://doi.org/10.1111/evo.13216

Peccoud J, Bonhomme J, Mahéo F et al (2014) Inheritance patterns of secondary symbionts during sexual reproduction of pea aphid biotypes. Insect Science 21:291–300. https://doi.org/10.1111/1744-7917.12083

Pons I, Renoz F, Noël C, Hance T (2019a) Circulation of the cultivable symbiont *Serratia symbiotica* in aphids is mediated by plants. Front Microbiol. https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.00764

Pons I, Renoz F, Noël C, Hance T (2019b) New insights into the nature of symbiotic associations in aphids: infection process, biological effects, and transmission mode of cultivable *Serratia symbiotica* bacteria. Appl Environ Microbiol. https://doi.org/10.1128/AEM.02445-18

R Core Team (2023) R: A language and environment for statistical computing. R foundation for statistical computing, Vienna. https://www.R-project.org/

Rabbinge R, Drees EM, van der Graaf M et al (1981) Damage effects of cereal aphids in wheat. Neth J Plant Pathol 87:217–232. https://doi.org/10.1007/BF02084437

Rahbé Y, Febvay G (1993) Protein toxicity to aphids: an in vitro test on *Acyrthosiphon pisum*. Entomol Exp Appl 67:149–160. https://doi.org/10.1111/j.1570-7458.1993.tb01663.x

Rahbé Y, Febvay G, Delobel B, Bournoville R (1988) *Acyrthosiphon pisum* performance in response to the sugar and amino acid composition of artificial diets, and its relation to lucerne varietal resistance. Entomol Exp Appl 48:283–292. https://doi.org/10.1111/j.1570-7458.1988.tb01175.x

Renoz F (2024) The nutritional dimension of facultative bacterial symbiosis in aphids: current status and methodological considerations for future research. Curr Res Insect Sci 5:100070. https://doi.org/10.1016/j.cris.2023.100070

Renoz F, Pons I, Vanderpoorten A et al (2019) Evidence for gut-associated *Serratia symbiotica* in wild aphids and ants provides new perspectives on the evolution of bacterial mutualism in insects. Microb Ecol 78:159–169. https://doi.org/10.1007/s00248-018-1265-2

Ribeiro Lopes M, Simonet P, Duport G et al (2021) Isolation of insect bacteriocytes as a platform for transcriptomic analyses. Methods Mol Biol 2170:185–198. https://doi.org/10.1007/978-1-0716-0743-5_13

Ribeiro Lopes M, Gaget K, Renoz F et al (2022) Bacteriocyte plasticity in pea aphids facing amino acid stress or starvation during development. Front Physiol. https://doi.org/10.3389/fphys.2022.982920

Ritz C, Baty F, Streibig JC, Gerhard D (2015) Dose-response analysis using R. PLoS ONE. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0146021

Rupawate PS, Roylawar P, Khandagale K et al (2023) Role of gut symbionts of insect pests: a novel target for insect-pest control. Front Microbiol. https://doi.org/10.3389/fmicb.2023.1146390

Thèse accessible à l'adresse : https://theses.insa-lyon.fr/publication/2025ISAL0089/these.pdf © [H. Terrasson], [2025], INSA Lyon, tous droits réservés

Russell JA, Moran NA (2005) Costs and benefits of symbiont infection in aphids: variation among symbionts and across temperatures. Proc Royal Soc b: Biol Sci 273:603–610. https://doi.org/10.1098/rspb.2005.3348

Sapountzis P, Duport G, Balmand S et al (2014) New insight into the RNA interference response against cathepsin-L gene in the pea aphid, *Acyrthosiphon pisum*: molting or gut phenotypes specifically induced by injection or feeding treatments. Insect Biochem Mol Biol 51:20–32. https://doi.org/10.1016/j.ibmb.2014.05.005

Scarborough CL, Ferrari J, Godfray HCJ (2005) Aphid protected from pathogen by endosymbiont. Science 310:1781–1781. https://doi.org/10.1126/science.1120180

Shai Y (2002) Mode of action of membrane active antimicrobial peptides. Pept Sci 66:236–248. https://doi.org/10.1002/bip.10260

Shigenobu S, Stern DL (2013) Aphids evolved novel secreted proteins for symbiosis with bacterial endosymbiont. Proc Royal Soc B: Biol Sci 280:20121952. https://doi.org/10.1098/rspb.2012.1952

Shigenobu S, Watanabe H, Hattori M et al (2000) Genome sequence of the endocellular bacterial symbiont of aphids *Buchnera* sp. APS Nat 407:81–86. https://doi.org/10.1038/35024074

Simon J-C, Boutin S, Tsuchida T et al (2011) Facultative symbiont infections affect aphid reproduction. PLoS ONE. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0021831

Simonet P, Duport G, Gaget K et al (2016) Direct flow cytometry measurements reveal a fine-tuning of symbiotic cell dynamics according to the host developmental needs in aphid symbiosis. Sci Rep 6:19967. https://doi.org/10.1038/srep19967

Simonet P, Gaget K, Balmand S et al (2018) Bacteriocyte cell death in the pea aphid/*Buchnera* symbiotic system. Proc Natl Acad Sci 115:E1819–E1828. https://doi.org/10.1073/pnas.1720237115

Sinno M, Bézier A, Vinale F et al (2020) Symbiosis disruption in the olive fruit fly, *Bactrocera oleae* (Rossi), as a potential tool for sustainable control. Pest Manag Sci 76:3199–3207. https://doi.org/10.1002/ps.5875

Skaljac M, Kirfel P, Grotmann J, Vilcinskas A (2018) Fitness costs of infection with *Serratia symbiotica* are associated with greater susceptibility to insecticides in the pea aphid. Pest Manag Sci 74:1829–1836. https://doi.org/10.1002/ps.4881

Smith TE, Moran NA (2020) Coordination of host and symbiont gene expression reveals a metabolic tug-of-war between aphids and *Buchnera*. Proc Natl Acad Sci 117:2113–2121. https://doi.org/10.1073/pnas.1916748117

Sochard C, Le Floch M, Anton S et al (2021) Limited influence of gain and loss of symbionts on host plant selection in specialized pea aphid genotypes. Entomol Generalis. https://doi.org/10.1127/entomologia/2020/1076

Suhag A, Yadav H, Chaudhary D et al (2021) Biotechnological interventions for the sustainable management of a global pest, whitefly (*Bemisia tabaci*). Insect Sci 28:1228–1252. https://doi.org/10.1111/1744-7917.12853

Therneau T (2024). *A Package for Survival Analysis in R*. R package version 3.7–0, https://CRAN.R-project.org/package=survival

Tsuchida T, Koga R, Fukatsu T (2004) Host plant specialization governed by facultative symbiont. Science 303:1989–1989. https://doi.org/10.1126/science.1094611

Tsuchida T, Koga R, Meng XY et al (2005) Characterization of a facultative endosymbiotic bacterium of the pea aphid *Acyrthosiphon pisum*. Microb Ecol 49:126–133. https://doi.org/10.1007/s00248-004-0216-2

Tsuchida T, Koga R, Fujiwara A, Fukatsu T (2014) Phenotypic effect of "*Candidatus Rickettsiella viridis*", a facultative symbiont of the pea aphid (*Acyrthosiphon pisum*), and its interaction with a coexisting symbiont. Appl Environ Microbiol 80:525. https://doi.org/10.1128/AEM.03049-13

Uchi N, Fukudome M, Nozaki N et al (2019) Antimicrobial activities of cysteine-rich peptides specific to bacteriocytes of the pea aphid *Acyrthosiphon pisum*. Microbes Environ 34:155–160. https://doi.org/10.1264/jsme2.ME18148

Vaucher RA, Teixeira ML, Brandelli A (2010) Investigation of the cytotoxicity of antimicrobial peptide P40 on eukaryotic cells. Curr Microbiol 60:1–5. https://doi.org/10.1007/s00284-009-9490-z

Wernegreen JJ (2012) Endosymbiosis. Curr Biol 22:R555–R561. https://doi.org/10.1016/j.cub.2012.06.010

Wimley WC (2010) Describing the mechanism of antimicrobial peptide action with the interfacial activity model. ACS Chem Biol 5:905–917. https://doi.org/10.1021/cb1001558

Wu Q, Patočka J, Kuča K (2018) Insect antimicrobial peptides, a mini review. Toxins 10:461. https://doi.org/10.3390/toxins10110461

Zytynska SE, Tighiouart K, Frago E (2021) Benefits and costs of hosting facultative symbionts in plant-sucking insects: a meta-analysis. Mol Ecol 30:2483–2494. https://doi.org/10.1111/mec.15897

Publisher's Note Springer Nature remains neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.

Springer Nature or its licensor (e.g. a society or other partner) holds exclusive rights to this article under a publishing agreement with the author(s) or other rightsholder(s); author self-archiving of the accepted manuscript version of this article is solely governed by the terms of such publishing agreement and applicable law.

Thèse accessible à l'adresse : https://theses.insa-lyon.fr/publication/2025ISAL0089/these.pdf © [H. Terrasson], [2025], INSA Lyon, tous droits réservés

Thèse accessible à l'adresse : https://theses.insa-lyon.fr/publication/2025ISAL0089/these.pdf © [H. Terrasson], [2025], INSA Lyon, tous droits réservés

CHAPITRE 3
CARACTERISATION DE LA LOCALISATION SPATIO-TEMPORELLE DE BCR4 AU SEIN DES BACTERIOCYTES

1 Contexte de l'étude

Dans la première partie de ma thèse, j'ai étudié la diversité des BCR chez les pucerons et je me suis intéressé à son activité bactéricide et insecticide. En plus de présenter une activité insecticide *in vivo*, l'ingestion de BCR4 entraîne une diminution drastique du nombre de symbiotes *Buchnera* chez *A. pisum*. Ces résultats suggèrent que BCR4 pourrait agir directement sur les symbiotes *in vivo*.

Pour approfondir la connaissance de ce peptide, il était indispensable de définir précisément la localisation du peptide BCR4, et de comprendre son évolution spatio-temporelle.

Shigenobu & Stern (2013) ont apporté de premiers éléments concernant l'étude de la localisation des BCR, en montrant que les ARNm codant ces peptides sont exprimés spécifiquement dans les bactériocytes embryonnaires et de jeunes adultes. Néanmoins, dans leur étude, la localisation des BCR au niveau protéique n'est pas présentée. Ainsi, il est difficile d'inférer sur le rôle des différents membres de cette famille multigénique de peptides. Elle ouvre aussi d'autres questions. Quelle est la localisation des BCR dans les stades nymphaux, une étape du développement du puceron où les symbiotes et les bactériocytes sont en pleine croissance (Simonet *et al.*, 2016b) ? Est-ce que les BCR sont aussi présents dans les stades tardifs du développement du puceron, dans les étapes de mort cellulaire bactériocytaire (Simonet et al, 2018) ? Et surtout, la mise en évidence de l'expression d'un gène ne permet pas d'affirmer que la protéine correspondante est effectivement traduite. De plus, le fait qu'un gène soit exprimé dans un tissu donné ne signifie pas nécessairement que la protéine traduite restera localisée dans ce même tissu, ou qu'elle y exercera sa fonction. Cela est particulièrement vrai pour les AMP, qui sont généralement produits dans certains tissus avant d'être sécrétés vers les tissus cibles, généralement

Thèse accessible à l'adresse : https://theses.insa-lyon.fr/publication/2025ISAL0089/these.pdf © [H. Terrasson], [2025], INSA Lyon, tous droits réservés

l'hémolymphe ou la lumière du tube digestif chez les insectes (Yu *et al.*, 2022 ; Bai *et al.*, 2021).

Afin de nous donner les moyens de localiser BCR4, nous avons fait produire un anticorps dirigé contre ce peptide.

L'utilisation de cet anticorps en western blot nous a permis de confirmer la présence du peptide sous sa forme peptidique, dans un extrait protéique de bactériocyte d'*A.pisum*.

Cet anticorps a ensuite été utilisé pour caractériser la localisation subcellulaire de BCR4 dans les bactériocytes du puceron du pois à différents stades de développement de l'insecte. Des expériences de co-marquage avec des anticorps anti-BCR4-GroEL ; anti-BCR4-KDEL et anti-BCR4-β-tubuline, nous ont permis de comparer cette localisation de BCR4 avec celle de *B. aphidicola* ; du réticulum endoplasmique (RE) et du cytosquelette des bactériocytes, respectivement.

Notre étude révèle notamment que BCR4 est présent dans tous les bactériocytes, quel que soit le stade de développement, et notamment les stades nymphaux et les stades adultes avancés et tardifs, qui n'avaient jamais été analysés jusque-là. BCR4 forme un maillage annulaire continu dans tout le cytoplasme, entourant les bactéries. Ce maillage n'est plus visible dans les régions du bactériocyte dépourvues de bactéries. Cette localisation et organisation diffèrent de celle du cytosquelette bactériocytaire et évoque plutôt celle du RE (Simonet *et al.*, 2018) et nos observations confirment la proximité de BCR4 avec ce compartiment endomembranaire.

Nous observons que BCR4 apparaît également sous la forme de points répartis de manière hétérogène dans le cytoplasme des bactériocytes. Ces points sont souvent situés entre les bactéries ou dans les zones dépourvues de symbiotes et pourraient correspondre à du BCR4 en cours de transport.

L'ensemble de ces résultats est présenté dans la partie suivante de ce **Chapitre 3**, et discuté en détail dans la section **Discussion générale** de ce manuscrit. Ces données feront l'objet d'une publication actuellement en préparation.

Thèse accessible à l'adresse : https://theses.insa-lyon.fr/publication/2025ISAL0089/these.pdf © [H. Terrasson], [2025], INSA Lyon, tous droits réservés

2 Matériels et méthodes

2.1 Élevage des pucerons

Des clones parthénogénétiques d'*A. pisum* (lignée LL01), ne contenant que le symbiote primaire, *B. aphidicola*, sont utilisés ici. L'absence de symbiotes secondaires fréquemment rencontrés chez le puceron du pois (*Hamiltonella defensa*, *Fukatsuia symbiotica*, *Regiella insecticola*, *Rickettsia sp.*, *Rickettsiella sp.*, *Serratia symbiotica* et *Spiroplasma sp.*) est vérifiée par PCR, selon la méthode décrite par Peccoud *et al.* (2014).

Les pucerons sont élevés sur de jeunes plants de fève (*Vicia faba*, L. cv. Aquadulce), à 21 °C, avec un cycle photopériodique de 16 h lumière / 8 h obscurité. Pour obtenir des individus aptères synchrones, des adultes ailés sont isolés sur plante hôte, autorisés à produire des nymphes pendant 24 h, puis retirés. Les nymphes ainsi obtenues y sont laissées pour se développer jusqu'aux stades souhaités (**cf Figure 24**).

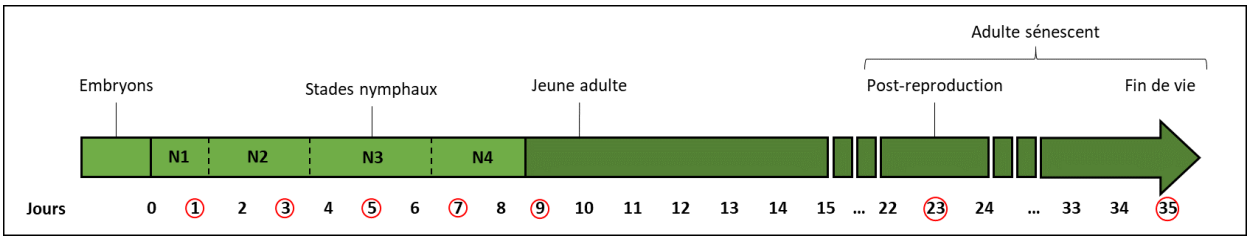


Figure 24 : Stades de développement du pucerons du pois en fonction du temps. Les jours auxquels les pucerons ont été prélevés pour cette étude sont entourés en rouge. *Inspiré de Simonet et al. (2016b).*

2.2 Production des anticorps anti-BCR4

Des anticorps anti-BCR4 ont été développés en collaboration avec l'entreprise BIOTEM (Apprieu, France). Nous avions l'avantage de disposer de la forme tridimensionnelle de la protéine (cf. Figure 6 de l'Article Loth *et al.* 2022), Cette information a été précieuse afin d'identifier les régions les plus exposées à l'environnement extérieur, et donc les plus susceptibles d'être reconnues par les anticorps. Deux séquences peptidiques ont ainsi été sélectionnées (DFDPTEFKGPFPTIEIC et CVEAAKERDQWFPY).

Thèse accessible à l'adresse : https://theses.insa-lyon.fr/publication/2025ISAL0089/these.pdf © [H. Terrasson], [2025], INSA Lyon, tous droits réservés

Les anticorps polyclonaux ont été produits par injection de ces peptides chez le lapin selon protocole d'immunisation du fabricant. A la réception, ils ont été testés contre le BCR synthétique et contre un extrait protéique de puceron.

2.3 Test des anticorps contre BCR4 synthétique en western blot

Des quantités croissantes de la protéine BCR4, préparée dans de l'eau bidistillée à une concentration de 1 mg/mL, ont été utilisées afin d'obtenir des masses finales de 0,0625 ; 0,125 ; 0,25 et 0,5 µg. Chaque échantillon est préparé dans un volume final de 10 µL, en mélangeant 2,5 µL de NuPAGE® LDS Sample Buffer (4X) (Thermo Fisher Scientific, MA, Whaltham, États-Unis), 1 µL de NuPAGE® Reducing Agent (10X) (Thermo Fisher Scientific, MA Whaltham, États-Unis), le volume adéquat de BCR4, puis en complétant avec de l'eau bidistillée. Les échantillons ont ensuite été chauffés à 70 °C pendant 10 minutes.

Les protéines ont été séparées par électrophorèse à 200V sur gel NuPAGE™ 4–12 % Bis-Tris Gel (Thermo Fisher Scientific, Whaltham, MA, États-Unis), en conditions dénaturantes dans un tampon de migration NuPAGE® MES SDS Running Buffe 1X. Un marqueur de poids moléculaire pré-coloré, Novex® Sharp Pre-Stained Protein Standard (Thermo Fisher Scientific, Whaltham, MA, États-Unis), a été utilisé.

Le transfert des protéines sur membrane de nitrocellulose a été réalisé à l'aide du système iBlot™ Gel Transfer Device (Thermo Fisher Scientific, Whaltham, MA, États-Unis) et du kit iBlot® Gel Transfer Stacks Nitrocellulose, Mini (Thermo Fisher Scientific, Whaltham, MA, États-Unis) à 20 V pendant 7 minutes.

La membrane a ensuite été bloquée pendant 1 h à température ambiante (TA) dans du Tris-Buffered Saline (TBS) contenant 5 % de lait écrémé en poudre (Sigma-Aldrich, Saint-Louis, MO, États-Unis), puis lavée avec du TBS-Tween (0,1 % Tween-20). Elle a été incubée pendant 1h à TA avec l'anticorps anti-BCR4 dilué au 1:500 dans du TBST. Après plusieurs lavages, la membrane a été incubée pendant 1h à TA avec un anticorps secondaire conjugué à la phosphatase alcaline (Thermo Fisher Scientific, Whaltham, MA, États-Unis) dilué au 1:50 000 dans du TBST. La révélation a été effectuée à l'obscurité avec la

Thèse accessible à l'adresse : https://theses.insa-lyon.fr/publication/2025ISAL0089/these.pdf © [H. Terrasson], [2025], INSA Lyon, tous droits réservés

solution 1-Step™ NBT/BCIP Substrate Solution (Thermo Fisher Scientific, Whaltham, MA, États-Unis) pendant un maximum de 15 minutes.

2.4 Dissection des bactériocytes

Les dissections ont été réalisées à l'aide d'aiguilles de microdissection, sous loupe binoculaire MDG-17 (Leica Microsystems, Wetzlar, Allemagne) à un grossissement de 25× à 40×, dans un tampon iso-osmotique glacé (0,025 M KCl, 0,01 M $MgCl_2$, 0,25 M saccharose, 0,035 M Tris-HCl, pH 7,5), selon la méthode décrite par Ribeiro Lopes *et al.* (2021). Les bactériocytes ont été collectés à l'aide de micropipettes de 20 µL munies d'embouts allongés, puis regroupés dans des lames-horloges. Pour la production d'un extrait protéique de bactériocytes, 50 pucerons au stade A9 ont été disséqués et leurs bactériocytes ont ensuite été centrifugés à 600 g pendant 3 minutes puis congelés à -20°C. Pour les marquages en immunohistochimie, entre 15 et 30 pucerons par stade ont été disséqués afin d'obtenir une quantité suffisante de bactériocytes. Ces derniers, fraichement disséqués, ont ensuite été immunomarqués selon le protocole décrit plus bas (cf. section 2.7). Pour les expériences d'immunohistochimie, les stades choisis ont été deux stades nymphaux (N2 et N4) et trois stades adultes (A9, A23 et A35).

2.5 Test des anticorps contre un extrait protéique de pucerons

Cette seconde étape avait pour objectif de tester la capacité des anticorps à détecter le BCR4 endogène du puceron du pois à partir d'un extrait protéique. Cinquante pucerons au stade A9 ont été disséqués selon le protocole précédemment développé au laboratoire (Ribeiro lopes *et al.*, 2021) permettant d'isoler un pool conséquent de bactériocytes. Les échantillons de bactériocytes ont été broyés à sec à l'aide d'un appareil Precellys® (Bertin Instruments, Montigny-le-Bretonneux, France), avec des billes métalliques, pendant 2 × 45 secondes à 8500 rpm. Après broyage, 400 µL d'eau ultra-haute qualité (UHQ) ont été ajoutés, et les échantillons ont été placés sur roue pendant 10 minutes à TA. Un volume de 100 µL d'acétonitrile (ACN) a ensuite été ajouté. Les lysats ont été centrifugés à 14 000 × g pendant 10 minutes. Le surnageant a été

Thèse accessible à l'adresse : https://theses.insa-lyon.fr/publication/2025ISAL0089/these.pdf © [H. Terrasson], [2025], INSA Lyon, tous droits réservés

lyophilisé, puis préparé en vue d'une migration sur gel selon le protocole décrit dans la Partie 2.3 de cette section « matériels et méthodes ». Deux gels identiques ont été préparés, chacun comportant trois types de dépôts : (i) la moitié de l'extrait protéique bactériocytaire ; (ii) 0,05 µg de BCR4 synthétique ; (iii) un marqueur de poids moléculaire.

Le premier gel a été coloré au bleu de Coomassie pendant 1h, puis lavé 3 x 1 h dans de l'eau chaude, afin de visualiser les protéines. Le second gel a été transféré sur membrane de nitrocellulose et marqué à l'anticorps anti-BCR4 (**cf. section 2.3**).

Les bandes révélées sur membranes ont ensuite été découpées sur le gel coloré au bleu de Coomassie. Elles ont été envoyées à l'Institut de Biologie et Chimie des Protéines (IBCP, Lyon, France) pour analyse par spectrométrie de masse (MS). Après décoloration des bandes, les protéines ont été réduites, alkylées et digérées à la trypsine pendant une nuit à 37 °C. L'échantillon a été injecté et analysé en mode TOP20 DDA HCD avec un gradient de 40 min. Les fichiers de données ont été traités à l'aide du logiciel Proteome Discoverer 2.5 en utilisant le moteur de recherche Sequest HT, en interrogeant la banque de données des contaminants les plus fréquemment retrouvés dans les analyses protéomiques. L'identification des protéines présentes dans les bandes a été réalisée par comparaison des séquences peptidiques identifiées en MS avec : (i) le protéome du puceron du pois disponible sur NCBI (GCF_005508785.2) ; (ii) les séquences peptidiques des sept BCR du puceron du pois. Les résultats ont été validés à un taux de faux positifs (FDR pour False Discovery Rate) inférieur ou égal à 1%.

2.6 Immunohistochimie sur coupe

Pour les analyses histologiques, des pucerons âgés de 9 jours (A9) ont été préparés selon le protocole suivant : les antennes et les pattes ont été retirées à l'aide de pinces de microdissection, puis les individus ont été fixés pendant 24 h à 4 °C dans une solution de PBS contenant 4 % de paraformaldéhyde et 0,1 % de Triton X-100. Après plusieurs lavages au PBS, les pucerons ont été inclus dans de l'agar à 1,3 %, déshydratés dans une série croissante d'éthanol (70 % à 100 %) et transférés dans du 1-butanol à 4 °C pendant au moins 24 h. L'inclusion en paraffine a été réalisée par immersion dans un mélange Paraplast/1-butanol

Thèse accessible à l'adresse : https://theses.insa-lyon.fr/publication/2025ISAL0089/these.pdf © [H. Terrasson], [2025], INSA Lyon, tous droits réservés

pendant 10 h, puis dans du Paraplast pur (Paraffine Paraplast Plus, Mc Cormick Scientific). Les blocs ont été coupés en sections de 3 µm à l'aide d'un microtome rotatif (HM340E, ThermoScientific, MA, Whaltham, États-Unis), puis les coupes ont été montées sur des lames polylysine et conservées à 4 °C.

Avant immunomarquage, les lames ont été déparaffinées deux fois 10 minutes dans du méthylcyclohexane, réhydratées par deux passages rapides dans de l'éthanol absolu, puis incubées successivement 2 minutes dans l'éthanol à 95 % et 70 %. Après un rinçage de 5 minutes dans du PBS, un blocage des sites non spécifiques a été effectué dans du PBS contenant 1 % de BSA pendant 30 minutes. Les coupes ont ensuite été incubées avec l'anticorps primaire anti-BCR4 (lapin ; développé en interne, produit par BIOTEM) dilué au 1:200 dans du PBS + 0,1 % de BSA (350–400 µl par lame), une nuit à 4 °C. Des témoins négatifs ont été inclus (PBS + BSA 0,1 %).

Le lendemain, les lames ont été lavées deux fois 5 minutes dans du PBS + 0,2 % de Tween-20, puis incubées à l'obscurité pendant 1 h à température ambiante avec l'anticorps secondaire (anti-IgG lapin, conjugué à la rhodamine C) dilué au 1:500 dans PBS + BSA 0,1 %. Après deux lavages au PBS + 0,2% de Tween-20, les lames ont été rincées dans du PBS puis dans de l'eau du robinet (5 minutes chacun). Les lames ont ensuite été séchées à température ambiante (1 à 3 h), puis montées sous hotte et à l'obscurité avec un milieu de montage contenant du DAPI (3 µl de DAPI à 1 mg/ml pour 1 ml de milieu). Les lames ont été conservées à 4 °C et observées dans les 8 jours au microscope à épifluorescence (Microscope Thunder Imager 3D Live Cell™, Leica Microsystems, Wetzlar, Allemagne) équipé des filtres d'émission appropriés. L'analyse des images est effectuée avec le logiciel ImageJ.

2.7 Immunohistochimie sur bactériocytes entiers

Les anticorps primaires suivants ont été utilisés pour l'immunohistochimie en montage entier : anti-GroEL de *Buchnera* (cochon d'inde ; dilution 1:200 ; fourni par le laboratoire d'H. Ishikawa), anti-KDEL (rat ; n° 50601 ; 1:200 ; Abcam, Cambridge Royaume-Uni), anti–β-tubuline (souris ; clone E7 ; 1:200 ; DSHB, Iowa City, IA, USA) et anti-BCR4 (lapin ; développé en interne, décrit ci-dessus). Des anticorps secondaires spécifiques d'espèces

Thèse accessible à l'adresse : https://theses.insa-lyon.fr/publication/2025ISAL0089/these.pdf © [H. Terrasson], [2025], INSA Lyon, tous droits réservés

(souris, lapin, rat, cochon d'inde) conjugués à la FITC ou à la rhodamine C (dilution 1:200 ; Jackson ImmunoResearch, WestGrove, PA, États-Unis) ont été utilisés.

L'immunomarquage a été réalisé selon la méthode décrite par Simonet *et al.* (2018), avec quelques modifications. Les bactériocytes fraîchement isolés (protocole d'après Ribeiro Lopes *et al.*, 2021) ont été fixés avec du paraformaldéhyde (PFA) à 4 % pendant 30 minutes à 4 °C, puis perméabilisés dans du tampon PAXD (PBS 1X contenant 5 % de BSA, 0,1 % Triton X-100 et 0,3 % désoxycholate de sodium) pendant 15 minutes. Deux lavages successifs ont été effectués avec du PAXD-Tween (PBS 1X contenant 5 % de BSA, 0,3 % Tween-20 et 0,3 % désoxycholate de sodium). Les échantillons ont ensuite été incubés toute la nuit à 4 °C, à l'obscurité, avec deux anticorps primaires combinés, dilués dans le tampon PAXD-Tween (anti-BCR4/anti-GroEL, anti-BCR4/anti-KDEL ou anti-BCR4/anti-tubuline), suivis d'une incubation avec les anticorps secondaires adaptés dans les mêmes conditions.

Les cellules marquées ont été montées sous loupe stéréomicroscopique (MDG-17, Leica Microsystems, Wetzlar, Allemagne) sur lames en verre dans du milieu de montage DABCO. Un scotch en forme de carré creux a été placé entre lame et lamelle afin d'éviter l'écrasement des bactériocytes. Entre 3 et 5 lames contenant chacune une dizaine de bactériocytes sont préparées et observées pour chaque stade et chaque co-marquage, en fonction de la quantité de cellules restant visibles sous loupes à la fin du traitement. Les traitements impliquant l'anticorps anti-GroEL et ceux impliquant des bactériocytes de pucerons A35 ont été répétés à cause d'un marquage de faible qualité, ou d'une trop faible quantité de bactériocytes restés intacts à la fin du traitement, respectivement. Les observations ont été réalisées au microscope confocal ZEISS LSM 800 (ZEISS Microscopy, Jena, Allemagne), à des grossissements de 40× à 100×. L'analyse des images a été effectuée avec le logiciel ImageJ.

Thèse accessible à l'adresse : https://theses.insa-lyon.fr/publication/2025ISAL0089/these.pdf © [H. Terrasson], [2025], INSA Lyon, tous droits réservés

3 Résultats

3.1 Détection de BCR4 synthétique et BCR4 endogène en western blot

Les expériences de western blot nous ont permis de détecter le BCR4 synthétisé au laboratoire, quelle que soit la quantité de protéine déposée (**Figure 25**). Nous avons observé que BCR4 a tendance à former des polymères par agrégation. Ces polymères ont été détectés par l'anticorps anti-BCR4 et sont apparus sous forme de bandes à des poids moléculaires croissants (**Figure 25**). La bande de plus faible poids moléculaire est détectée entre 3,5 et 10 kDa, ce qui correspond au poids théorique du peptide BCR4 synthétique (5,9 kDa).

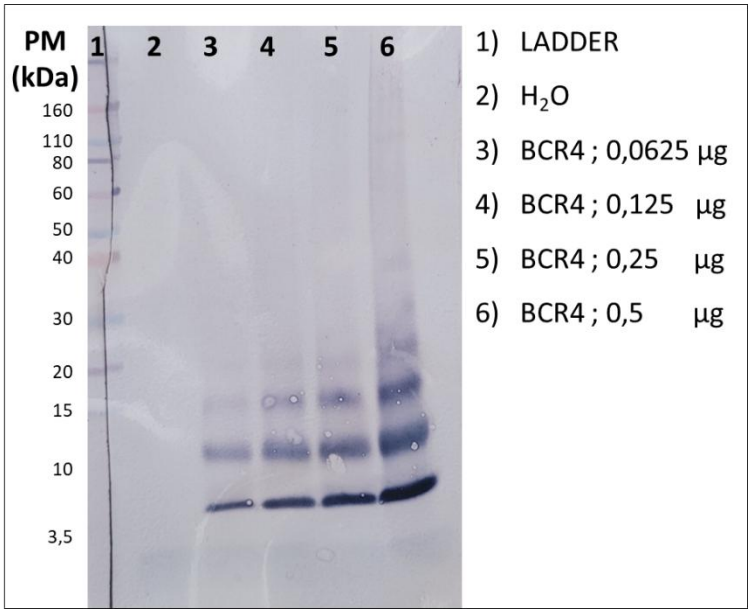


Figure 25 : Détection de BCR4 synthétique par les anticorps anti-BCR4 en western blot. La bande 1 correspond au marqueur de taille avec les poids moléculaires (PM) exprimé en kiloDalton (kDa). Les bandes 2, à 6 correspondent aux protéines transférées sur la membrane de nitrocellulose après dépôt de solutions contenant : de l'eau bidistillée (bande 2) ou des concentrations croissantes de BCR4 (bandes 3 à 6). La bande nette de plus faible poids moléculaire correspond au peptide BCR4 monomérique. Les bandes situées à des poids moléculaires supérieurs correspondent à des agrégats de deux, trois voire quatre molécules de BCR4.

L'anticorps anti-BCR4 a permis de révéler deux bandes distinctes dans l'extrait protéique des bactériocytes de puceron A9 (**Figure 26**). Une première bande a été observée à environ 30 kDa tandis qu'une seconde est visible à une taille inférieure à 10 kDa, mais supérieure à celle correspondant au BCR4 synthétique (5,9 kDa). Afin de confirmer la présence de BCR4 dans les bandes révélées par l'anticorps, trois bandes aux tailles détectées ont été découpées et analysées par MS. Pour la bande la plus basse révélée sur membrane, deux bandes ont été découpées sur le gel afin de garantir que l'une d'elles correspondait effectivement au signal observé sur la membrane. Les analyses MS, réalisées à

Thèse accessible à l'adresse : https://theses.insa-lyon.fr/publication/2025ISAL0089/these.pdf © [H. Terrasson], [2025], INSA Lyon, tous droits réservés

l'aide de l'algorithme « Sequest HT », ont confirmé la présence de BCR4 dans les trois bandes analysées avec un taux de faux positif inférieur à 1% (**Tableau 1**).

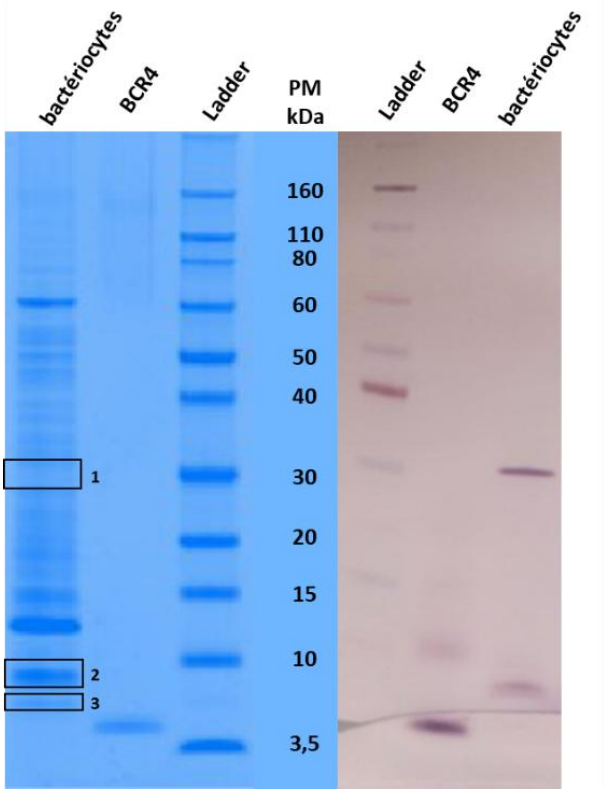


Figure 26 : Détection de BCR4 par les anticorps anti-BCR4 en westernblot, à partir d'un extrait protéique de bactériocyte d'*A. pisum* âgés de 9 jours. La partie gauche correspond au gel coloré au bleu de coomassie. Les rectangles indiquent les bandes découpées pour analyse par spectrométrie de masse. La partie droite montre la membrane de nitrocellulose sur laquelle les protéines ont été transférées, puis révélées à l'aide de l'anticorps anti-BCR4. Le ladder (marqueur de poids moléculaire) est indiqué au centre, avec les tailles correspondantes en kiloDaltons (kDa).

Tableau 1 : Détection de BCR4 endogène dans les extraits protéiques bactériocytaires par spéctrométrie de masse. Dans chacune des trois bandes obtenues en westernblot, est indiqué le nombre de protéines détectée, le taux de couverture et le nombre de peptides (surlignés en jaune) correspondant à la séquence de BCR4 avec un taux de faux positif inférieur à 1%.

Bande 1 : 260 protéines sont détectées dont
Apis-BCR4 : 16% de couverture, 1 peptide :
MRLLYGFLIIMLTIYLSVQDFDPTEFKGPFPTIEICSKYCAVVCNYTSRPCYCVEAAKERDQWFPYCYD
Bande 2 : 78 protéines sont détectées dont
Apis-BCR4 : 32% de couverture, 3 peptides :
MRLLYGFLIIMLTIYLSVQDFDPTEFKGPFPTIEICSKYCAVVCNYTSRPCYCVEAAKERDQWFPYCYD
Bande 3 : 86 protéines sont détectées dont
Apis-BCR4 : 32% de couverture, 3 peptides :
MRLLYGFLIIMLTIYLSVQDFDPTEFKGPFPTIEICSKYCAVVCNYTSRPCYCVEAAKERDQWFPYCYD

Thèse accessible à l'adresse : https://theses.insa-lyon.fr/publication/2025ISAL0089/these.pdf © [H. Terrasson], [2025], INSA Lyon, tous droits réservés

3.2 Localisation subcellulaire de BCR4 dans les bactériocytes en fonction du stade de développement

3.2.1 Immunolocalisation de BCR4 sur coupe

Afin de vérifier la présence du peptide BCR4 dans les bactériocytes d'*A. pisum*, un immunomarquage a été réalisé à partir de pucerons au stade A9, l'un des stades stade pour lesquels l'expression de BCR4 a été rapportée (Shigenobu et Stern, 2013). L'observation des coupes négatives BCR4$^-$ (l'anticorps primaire est remplacé par du PBS) a révélé une autofluorescence visible dans les longueurs d'ondes analysées, notamment au niveau de la cuticule des embryons (**Figure 27a**). En revanche, aucun signal n'a été détecté dans les bactériocytes **(Figure 27a'')**.

A l'inverse, l'observation des coupes traitées avec l'anticorps anti-BCR4 (BCR4$^+$) a révélé un signal dans les bactériocytes (**Figure 27b**). Ce signal a été observé à la fois en périphérie des bactériocytes et sous forme de points

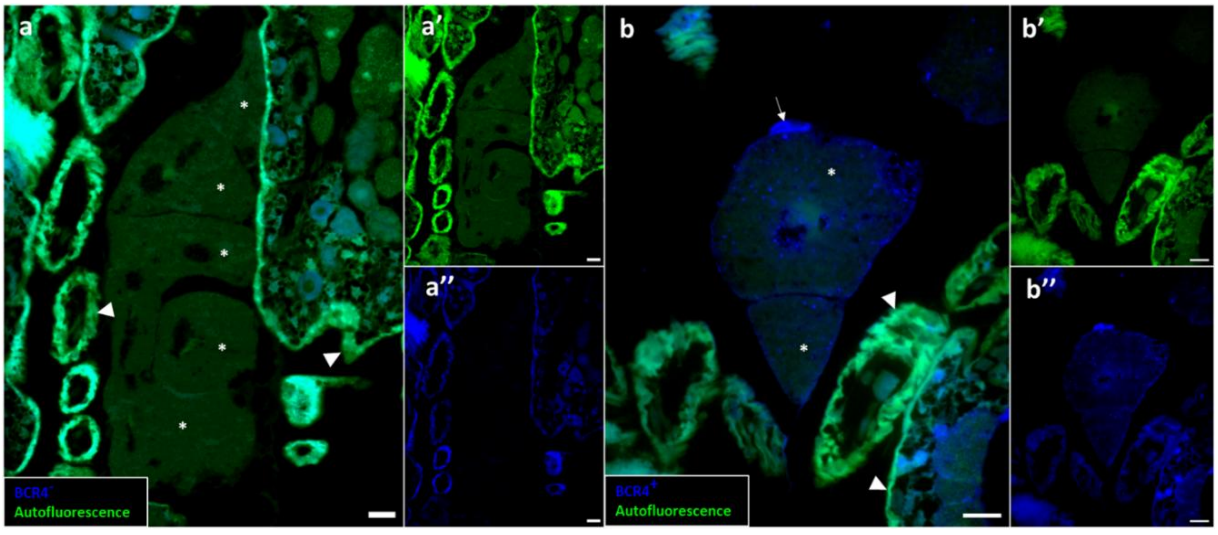


Figure 27 : Immunolocalisation du peptide BCR4 sur coupe de puceron A9. (a) Observation des bactériocytes sans anticorps anti-BCR4 (BCR4$^-$). L'astérisque correpond aux bactériocytes et les têtes de flèches blanches pointent une partie de la cuticule d'embryons. L'image (a) correspond à l'addition des canaux vert (a' ; autofluorescence) et bleu (a'' ; pas d'anticorps anti-BCR4). **(b)** Observation des bactériocytes avec anticorps anti-BCR4 (BCR4$^+$). L'astérisque correpond aux bactériocytes, les têtes de flèches blanches pointent une partie de la cuticule d'embryons et la flèche blanche pointe une zone intensément marquées à la périphérie d'un bactériocyte, faisant penser à une « sheath cell ». L'image (b) correspond à l'addition des canaux vert (b' ; autofluorescence) et bleu (a'' ; anticorps anti-BCR4). Bar : 20 µm.

Thèse accessible à l'adresse : https://theses.insa-lyon.fr/publication/2025ISAL0089/these.pdf © [H. Terrasson], [2025], INSA Lyon, tous droits réservés

répartis de manière hétérogènes dans tout le cytoplasme. Par ailleurs, lors de certaines observations, des zones intensément marquées ont été détectées à la périphérie de certains bactériocytes (**Figure 27b**). Ces zones, situés en dehors du bactériocyte pourraient correspondre à des « sheath cells », des cellules adjacentes aux bactériocytes, qui ne contiennent jamais le symbiote primaire *B. aphidicola* et dont le rôle est encore inconnu.

3.2.2 Localisation de BRC4 en fonction du stade de développement, des symbiotes du cytosquelette et du réticulum endoplasmique

L'immunomarquage de bactériocytes entiers a été utilisé pour analyser la localisation subcellulaire du peptide BCR4 par observation en microscopie confocale. Cette technique offre une meilleure résolution d'image que les coupes histologiques et permet de réaliser des co-marquages avec d'autres anticorps ciblant des compartiments endomembranaires du bactériocytes. Bien que les co-marquages soient également envisageables sur coupes histologiques, les essais réalisés se sont révélés non concluants en raison d'un signal faible et peu résolutif.

Dans un premier temps, la microscopie confocale a été utilisée afin de localiser BCR4 en relation avec *B. aphidicola,* à l'aide d'un co-marquage avec les anticorps adressés contre BCR4 utilisés en parallèle d'anticorps anti-GroEL. **(Figure 28**). Pour cette expérience, les stades choisis ont été : les deux stades nymphaux N2 et N4, et les trois stades adultes A9 (premier stade de vie adulte du puceron), A23 [le stade de la vie adulte où le vieillissement des pucerons démarre selon Simonet *et al*. (2016)] et le stade A35 (un stade très avancé, où il n'y a plus que quelques bactériocytes dans le corps de l'insecte). En raison de la faible qualité ou de l'absence de signal exploitable du marquage anti-GroEL à certains stades, notamment N4 et A23, dus à des problèmes récurrents de reproductibilité ou de pénétration de cet anticorps, seules les images des stades N2, A9 et A35 ont pu être analysées de manière fiable.

Chez les individus N2 et A9, les bactériocytes présentent un cytoplasme presque entièrement occupé par les bactéries, à l'exception de quelques zones de faible densité symbiotique chez les individus A9, identifiées comme les régions hypervacuolaires décrites par Simonet *et al.* (2018) (**Figure 28a-b**). Chez les individus A35, ces zones hypervacuolaires s'étendent progressivement à

Thèse accessible à l'adresse : https://theses.insa-lyon.fr/publication/2025ISAL0089/these.pdf © [H. Terrasson], [2025], INSA Lyon, tous droits réservés

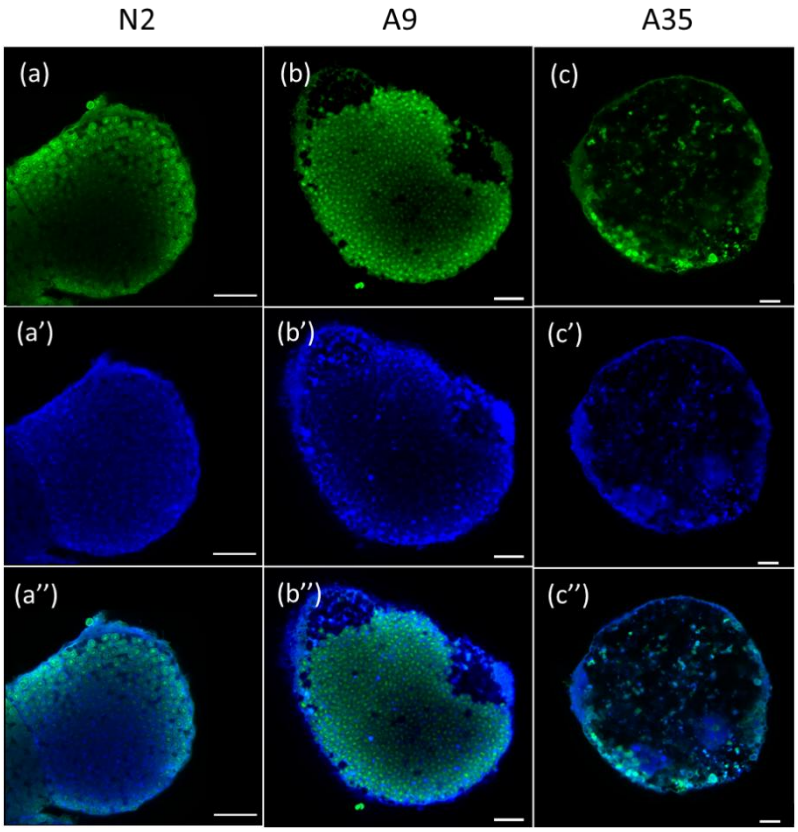


Figure 28 : Localisation subcellulaire de BCR4 et *Buchnera* dans les bactériocytes d'*A. pisum*, en fonction du développement. (**a-c'')** Bactériocytes de puceron au stade nymphal 2 (N2), jeune adulte (A9) et adulte scénescant (A35) observés au microscope confocal. (**a-c)** Marquage groEL, en vert, permettant de visualiser les *Buchnera*. (**a'-c')** Marquage BCR4, en bleu, montrant sa localisation dans la cellule. **(a''-c'')** Superposition des deux canaux. Barre = 10 µm.

l'ensemble de la cellule, traduisant une désorganisation croissante (**Figure 28c**). Seules quelques bactéries subsistent, principalement à la périphérie de la cellule. Au centre, un marquage avec l'anticorps anti-GroEL reste néanmoins visible, mais ne semble pas correspondre à des bactéries viables : le signal apparait morcelé, sous forme de petits agrégats de taille hétérogènes, contrairement aux bactéries qui présentent une forme circulaire bien définie et de taille homogène (**Figure 28c**).

Le signal BCR4 a été détecté dans l'ensemble des bactériocytes observés, à tous les stades, pour lesquels nous avons obtenu des images exploitables (N2, A9 et A35). Il est visible à la périphérie de la cellule, dans les zones hypervacuolaires ainsi qu'au centre du bactériocyte (**Figure 28a'-c'**). Aux stades N2 et A9, le marquage de BCR4 s'organise en maillage continue de structures annulaires (**Figure 28a'-b'**). Ce maillage entoure individuellement l'ensemble des bactéries (**Figure 28a''-b''**). Chez les individus A35, le maillage n'est présent que là où il y a des bactéries sont, mais tend à disparaître dans la

Thèse accessible à l'adresse : https://theses.insa-lyon.fr/publication/2025ISAL0089/these.pdf © [H. Terrasson], [2025], INSA Lyon, tous droits réservés

région centrale, désormais dépourvue de symbiotes (**Figure 28c'-c''**). En plus de cette organisation en maillage, le signal BCR4 se présente aussi sous la forme de point lumineux, répartis de manière hétérogène dans le cytoplasme, et visibles à tous les stades (**Figure 28a'-c'**).

La localisation de BCR4 a ensuite été comparée à celle du RE, grâce à un co-marquage avec les anticorps adressés contre BCR4 et des anticorps anti-KDEL (marque les protéines résidentes du RE) (**Figure 29**). Pour cette expérience, des images exploitables pour tous les stades considérés ont été observées. Le signal BCR4 aux stades N2 et N4 correspond à celui du stade N2 tel que décrit précédemment (**Figure 29b'**). Au stade A23, le signal reste globalement similaire à celui du stade A9, à la différence que le « maillage » formé par BCR4 s'étend moins profondément vers le centre de la cellule, et que de plus gros points sont visibles dans la zone hypervacuolaire (**Figure 29e'**).

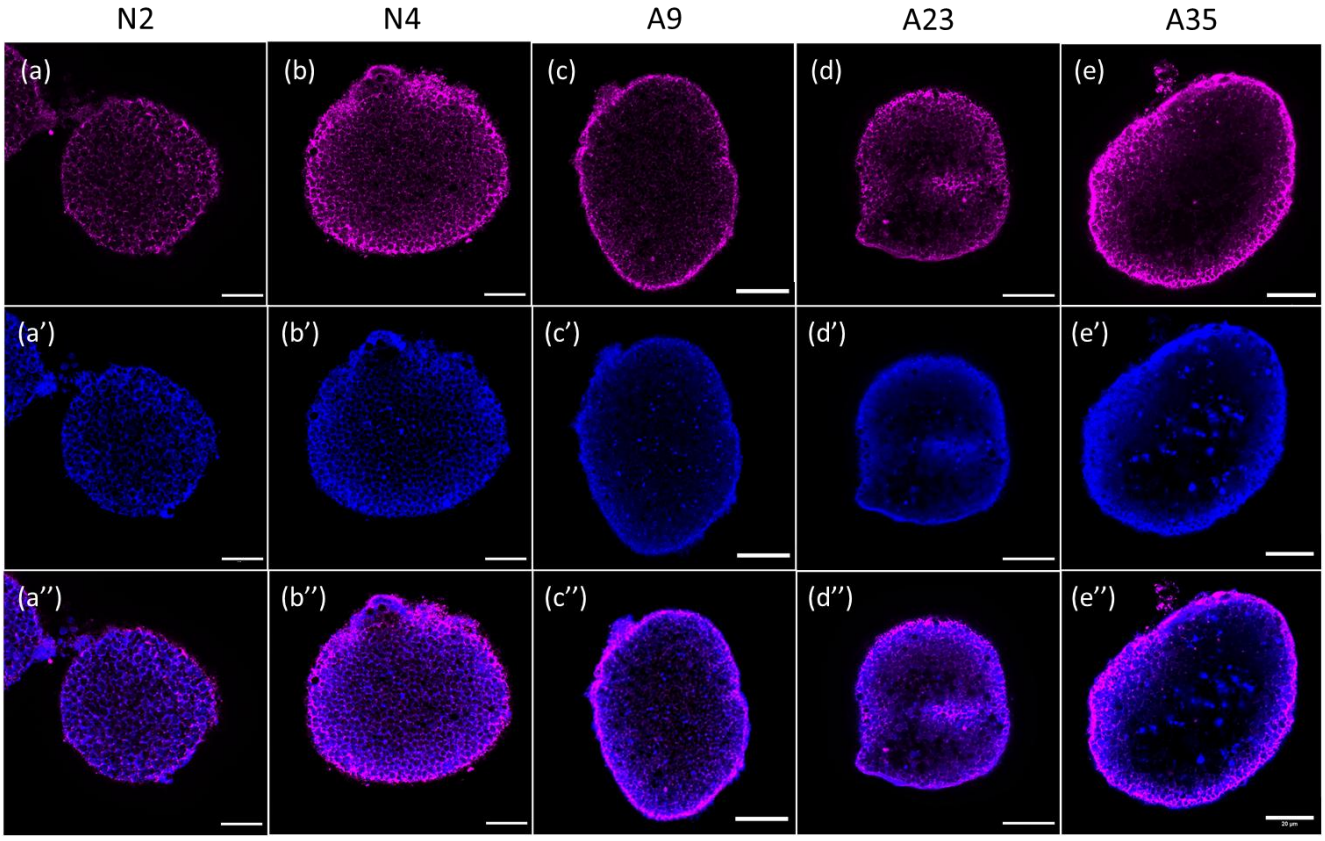


Figure 29 : Localisation subcellulaire de BCR4 en lien avec l'organisation du réticulum endoplasmique dans les bactériocytes d'*A. pisum* en fonction du développement. (a-e'') Bactériocytes de puceron au stade nymphal 2 (N2) et 4 (N4), jeune adulte (A9) et adulte scénescant âgés de 23 jours (A23) et 25 jours (A35) observés au microscope confocal. **(a-e)** Marquage KDEL, en violet, permettant de visualiser le réticulum endoplamique. **(a'-e')** Marquage BCR4, en bleu, montrant sa localisation dans la cellule. **(a''-e'')** Superposition des deux canaux. Bar = 20 µm.

Thèse accessible à l'adresse : https://theses.insa-lyon.fr/publication/2025ISAL0089/these.pdf © [H. Terrasson], [2025], INSA Lyon, tous droits réservés

Dans les bactériocytes aux stades N2, N4 et A9, le signal KDEL forme un réseau réticulé, continu et annulaire très semblable à celui de BCR4 (**Figure 29a-c''**). Le signal BCR4 apparaît toutefois plus lisse et plus régulier que celui de KDEL, mais les deux présentent une organisation similaire autour des symbiotes (qui ne sont pas marqués ici, mais sont suggérées en noir dans ces images). Quelques points marqués par KDEL sont parfois visibles, mais ils sont moins nombreux et ne coïncident pas avec ceux marqués par BCR4. Aux stades A23 et A35, le « maillage » formé par le signal KDEL est encore visible à la périphérie de la cellule, à l'instar de BCR4 (**Figure 29d-e''**). Cependant, ce « maillage » KDEL, bien que plus morcelé, s'étend bien plus profondément vers le centre cellule que le celui formé par BCR4, pour lequel seuls de gros agrégats sont visibles dans cette région (**Figure 30**). Au centre, le signal KDEL correspond à des vacuoles que les travaux de Simonet *et al.* (2018), ont démontré avoir pour origine le RE.

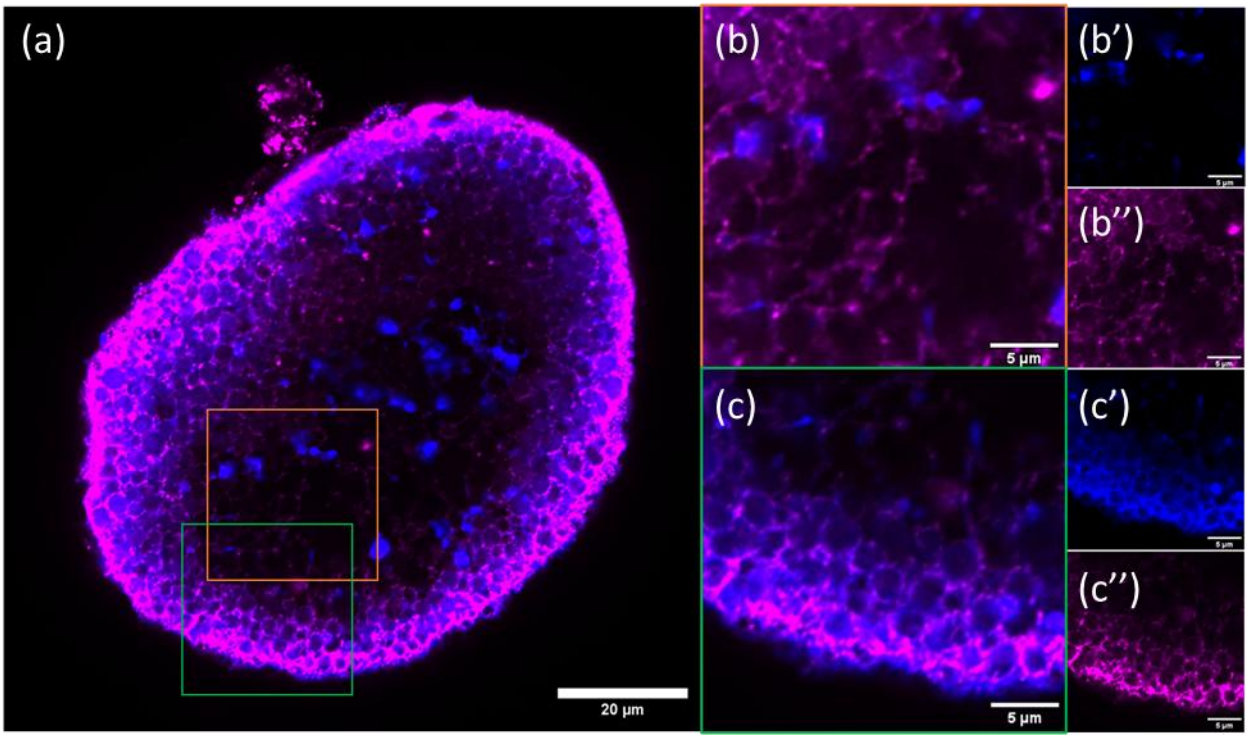


Figure 30 : : Comparaison entre la localisation de BCR4 et le réticulum endoplasmique dans les bactériocytes de pucerons sénescents. (a) Vue entière d'un bactériocyte de puceron âgé de 35 jours observé au microscope confocal, avec en bleu le marquage BCR4 et en magenta le marquage KDEL qui permet d'observer le réticulum endoplasmique. (**b-c)**Vue zoomée sur la partie centrale **(b)** ou périphérique **(c)** du bactériocyte, accompagné du marquage BCR4 seul **(b' et c')** ou KDEL seul **(b'' et c'')**. Bar : vues globales = 20 µm ; vues zoomées = 5 µm.

Thèse accessible à l'adresse : https://theses.insa-lyon.fr/publication/2025ISAL0089/these.pdf © [H. Terrasson], [2025], INSA Lyon, tous droits réservés

Pour aller plus loin, nous avons cherché à comprendre comment la localisation subcellulaire de BCR4 s'organise en relation avec une autre structure intracellulaire du bactériocyte : le cytosquelette. Pour cela, nous avons réalisé des co-marquages en utilisant les anticorps adressés contre BCR4 en même temps que des anticorps anti-β-tubuline et observé des bactériocytes de pucerons aux stades N2, N4, A9, A23 et A35 (**Figure 31**).

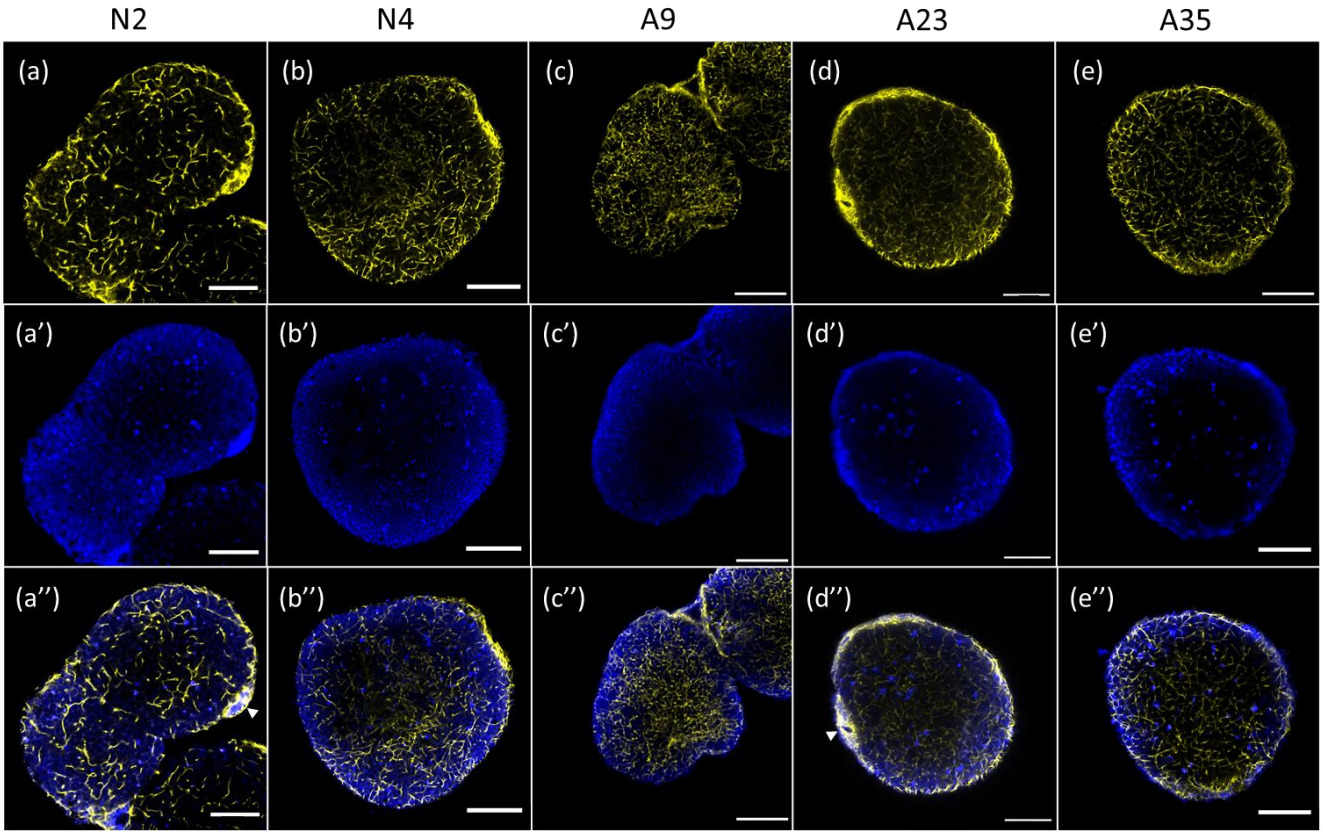


Figure 31 : : Localisation subcellulaire de BCR4 en lien avec l'organisation du cytosquelette dans les bactériocytes d'*A. pisum* en fonction du développement. (a-e'') Bactériocytes de puceron au stade nymphal 2 (N2) et 4 (N4), jeune adulte (A9) et adulte scénescant âgés de 23 jours (A23) et 25 jours (A35) observés au microscope confocal. **(a-e)** Marquage β-tubuline, en jaune, permettant de visualiser le cytosquelette. **(a'-e')** Marquage BCR4, en bleu, montrant sa localisation dans la cellule. **(a''-e'')** Superposition des deux canaux. Bar = 20 µm.

Le cytosquelette dans les bactériocytes forme un large réseau de filaments entrelacés qui occupe l'ensemble du volume cellulaire. (**Figure 31a-e**). Ce réseau ne correspond pas à l'organisation en maillage observé pour BCR4 ou KDEL autour des bactéries (**Figure 31a''-e''**). Cependant, les points formés par le signal BCR4 sont toujours superposés, à des filaments du cytosquelette, ou localisés à leur proximité (**Figure 31a''-e''**).

De plus, le signal β-tubuline forme parfois des renflements aplatis à la périphérie des bactériocytes (**Figure 31a et 31d**). Ces renflements, qui

Thèse accessible à l'adresse : https://theses.insa-lyon.fr/publication/2025ISAL0089/these.pdf © [H. Terrasson], [2025], INSA Lyon, tous droits réservés

correspondent à des « sheath cells » (Simonet et al., 2018) sont également marqués par un signal BCR4 très intense et homogène (**Figure 31a'' et d''**).

4. Discussion

Dans cette partie, je vais résumer les résultats obtenus dans ce chapitre et proposer quelques éléments d'interprétation. Les résultats seront toutefois discutés plus en profondeur dans la section ***Discussion générale*** *de ce manuscrit.*

Dans la troisième partie de mes travaux de thèse, j'ai contribué à la production du premier anticorps dirigé contre le peptide BCR4, un outil majeur dans l'étude de ce peptide. Cet anticorps semble être fonctionnel et spécifique, comme l'ont démontré les expériences de western blot en utilisant le BCR4 synthétique ou des extraits protéiques du bactériocyte du puceron du pois. Les résultats de l'expérience de western blot ont aussi révélé la présence de deux bandes distinctes dans lesquelles BCR4 a été identifié par l'analyse MS. La première bande, légèrement plus haute que celle correspondant au BCR4 synthétique suggère que le profil de migration du BCR4 endogène est modifié dans l'extrait bactériocytaire, comparé au peptide synthétique purifié. La deuxième bande, en revanche, est plus haute (environ 30 kDa) que la taille attendue pour BCR4 (environ 5,9 kDa). Des modifications post-traductionnelles impliquant l'ajout de protéines, ou groupements protéiques à BCR4 par liaisons covalentes pourraient expliquer ce phénomène (Pillai-Kastoori *et al.*, 2020).

Ces travaux nous ont aussi permis de démontrer, pour la première fois, la présence du peptide BCR4 chez les bactériocytes du puceron du pois en utilisant des approches complémentaires, le western blot et l'immunohistochimie, et de décrire sa localisation subcellulaire dans ces cellules.

Les observations immunohistologiques sur coupe ont permis de localiser BCR4 dans le cytoplasme des bactériocytes d'*A. pisum* au stade A9. L'immunomarquage de bactériocytes isolés, observés en microscope confocal a permis de préciser cette localisation subcellulaire en fonction du développement du puceron. BCR4 est présent dans l'ensemble du cytoplasme du bactériocyte. Là où des symbiotes sont présents, il s'organise en un réseau continue, formant

Thèse accessible à l'adresse : https://theses.insa-lyon.fr/publication/2025ISAL0089/these.pdf © [H. Terrasson], [2025], INSA Lyon, tous droits réservés

un maillage qui entoure individuellement les bactéries. Ce réseau est très similaire à celui formé par le RE. La proximité avec *Buchnera* renforce l'hypothèse selon laquelle BCR4 pourrait jouer un rôle dans la symbiose, peut-être en interagissant directement avec les bactéries. La proximité avec le RE est cohérente avec le fait que BCR4 possède un peptide signal de sécrétion ou d'adressage. Compte tenu du fait que BCR4 n'a pas été observé à l'extérieur du bactériocyte, il est peu probable que BCR4 soit sécrété. Une hypothèse alternative proposée par Shigenobu et Stern (2013) est que le peptide signal de BCR4 soit utilisé pour acheminer le peptide vers la membrane symbiosomale, une structure membraneuse entourant *B. aphidicola* et qui semble communiquer avec le réticulum endoplasmique du bactériocyte.

BCR4 forme également des agrégats visibles sous forme de petits points fluorescents répartis de manière hétérogène dans les bactériocytes. Si BCR4 est bien pris en charge par le système d'adressage des peptides *via* le réticulum endoplasmique, ces points pourraient correspondre à des vésicules de transport en transit contenant du BCR4. Ce mode de transport a été décrit pour les peptides NCR chez la légumineuse *Medicago truncatula*. Ces peptides sont notamment transportés vers la membrane symbiosomale contenant les endosymbiotes *via* le système de sécrétion spécifique aux nodules. (Van de Velde *et al.*, 2010 ; Wang *et al.*, 2010). Par ailleurs, ces agrégats de BCR4 rappellent ceux formés par des AMP comme la drosomycine lors de leur transport vésiculaire vers la membrane plasmique avant d'être sécrétés en réponse à une infection bactérienne chez *D. melanogaster* (Shandala *et al.*, 2011). La stricte proximité du marquage BCR4 avec les microtubules soutient cette hypothèse, dans la mesure où les vésicules circulent le long du cytosquelette dans les cellules (Fourriere *et al.*, 2020).

A partir du stade A9, dans les zones dépourvues de bactéries (qui correspondent à des amas de vacuoles formées par le RE ; Simonet *et al.*, 2018), le maillage de BCR4 disparait. Par ailleurs, à partir du stade A9, et de manière plus fréquente au stade A35, BCR4 est parfois détecté au contact de bactéries marquées par GroEL, possiblement engagées dans un processus de dégradation lysosomale ou autophagique, comme déjà rapporté par Simonet *et al.* (2018). Il est possible que l'action de BCR4 ait contribué à déclencher, conjointement à d'autres processus cellulaires, la dégradation de certaines bactéries, en

Thèse accessible à l'adresse : https://theses.insa-lyon.fr/publication/2025ISAL0089/these.pdf © [H. Terrasson], [2025], INSA Lyon, tous droits réservés

perméabilisant leur membrane (Uchi *et al.*, 2019), entraînant leur prise en charge par des lysosomes et/ou autophagosomes.

Enfin, le marquage anti-β-tubuline a permis de mettre en évidence la présence de « sheath cells » accolées à certains bactériocytes. Le rôle de ces cellules reste inconnu à ce jour, mais leur cytoplasme est fortement marqué par BCR4, aussi bien au stade nymphal qu'au stade adulte. La présence de ce peptide dans ces cellules est difficile à expliquer, des hypothèses seront proposées dans la section **Discussion générale** de ce manuscrit.

En conclusion, cette étude a permis de démontrer pour la première fois la présence de BCR4 chez le puceron au niveau protéique. L'utilisation d'anticorps spécifiques a permis de décrire avec précision sa localisation subcellulaire dans les bactériocytes. Ces résultats renforcent l'hypothèse selon laquelle BCR4 serait impliqué dans la symbiose chez le puceron du pois, et pourrait être en contact avec le système de transport vésiculaire / la membrane symbiosomale du bactériocyte.

Thèse accessible à l'adresse : https://theses.insa-lyon.fr/publication/2025ISAL0089/these.pdf © [H. Terrasson], [2025], INSA Lyon, tous droits réservés

DISCUSSION GENERALE

Au cours de ma thèse, je me suis intéressé à la régulation de la symbiose dans le modèle *Acyrthosiphon pisum*/*Buchnera aphidicola* à travers une approche pluridisciplinaire centrée sur l'étude du rôle des peptides « Bacteriocyte-specific Cysteine-Rich (BCR) ».

En plus de faire partie des gènes les plus surexprimés dans les bactériocytes par rapport au reste du corps du puceron du pois (Shigenobu & Stern, 2013), les BCR partagent des caractéristiques structurales communes avec certains peptides antimicrobiens (AMP), notamment ceux de type défensine. La première partie de ma thèse visait à étudier ces peptides sous trois angles complémentaires : l'analyse de leur structure, de leur activité antimicrobienne et insecticide, ainsi que la reconstruction de leur histoire évolutive par des analyses phylogénétiques (**Chapitre 1**).

Diversité des BCR chez les pucerons : synonyme de diversification fonctionnelle ?

Des analyses génétiques comparatives (BLAST) ont révélé que les BCR ne sont pas spécifiques au puceron du pois, mais sont également présents dans le génome d'au moins 20 autres espèces de pucerons. Fait intéressant, ces espèces appartiennent toutes à la super-famille des Aphidoidea, qui regroupe l'ensemble des espèces de pucerons. L'absence de BCR dans d'autres familles d'insectes, y compris parmi des groupes phylogénétiquement proches, suggère une origine évolutive conjointe des BCR et des pucerons. Plus précisément, ces peptides semblent restreints à la famille des Aphidinae, à l'exception notable de *Cinara cedri* (Lachninae), qui possède un BCR apparenté au type BCR3. Comme présenté en introduction (**Partie 1**), les pucerons de la famille Aphidinae vivent en symbiose obligatoire uniquement avec *Buchnera*, contrairement à ceux des autres familles étudiées (Anoeciinae, Chaitophorinae, Drepanosiphinae, Lachninae), qui hébergent fréquemment un symbiote co-obligatoire en plus de *Buchnera*. Il est possible que la perte des gènes codant les BCR chez ces espèces ait favorisé l'acquisition et la fixation de ces symbiotes supplémentaires. En effet, ces derniers pourraient être sensibles aux BCR, ou bien, sachant que les souches de *Buchnera* associées à ces espèces présentent généralement un génome

Thèse accessible à l'adresse : https://theses.insa-lyon.fr/publication/2025ISAL0089/these.pdf © [H. Terrasson], [2025], INSA Lyon, tous droits réservés

plus réduit (Lu et al., 2024), la perte de certains gènes essentiels pourrait avoir accru leur sensibilité aux BCR, conduisant ainsi à une contre-sélection de ces peptides.

Un autre point commun entre ces 20 espèces est leur relation symbiotique avec *B. aphidicola*. Cela renforce l'hypothèse d'une coévolution des BCR en lien avec ce symbiote. Pour vérifier si les BCR sont spécifiques aux pucerons ou plutôt à *B. aphidicola*, il serait intéressant de rechercher leur présence dans les génomes, non disponibles aujourd'hui, des rares Aphididae ayant perdu *B. aphidicola* (Vogel & Moran, 2013 ; Chong & Moran, 2018), afin de vérifier s'ils ont également perdu les BCR ou s'ils en possèdent des formes pseudogénéisées. Cependant, même si toutes les espèces identifiées à ce jour qui possèdent au moins un BCR vivent également en symbiose avec *Buchnera*, la réciproque n'est pas toujours vraie : aucun BCR n'a été retrouvé chez *Sipha flava* (Chaitophorinae) ni chez *Eriosoma lanigerum* (Eriosomatinae). Il serait alors pertinent de rechercher les BCR dans les nouveaux génomes de la famille des Aphididae séquencés depuis l'étude de Loth *et al*. (2022). Seuls 22 génomes références étaient disponibles au moment de ces analyses, en 2021, contre 41 génomes disponibles aujourd'hui (dont 26 Aphidinae) afin d'établir une relation précise entre espèce de puceron et présence des différentes sous-familles de BCR. Ces analyses restent néanmoins limitées par la petite taille des BCR et la divergence importante des séquences inter-cystéiques, qui compliquent leur détection par BLAST. Le développement de nouveaux outils de bioinformatique, tels que PepTraq (Zanuttini *et al.*, 2023), ainsi que l'arrivée de nouveaux génomes dans les bases de données publiques, devraient permettre d'identifier de nouveaux BCR chez d'autres espèces.

La découverte de nouveaux BCR dans d'autres pucerons que le puceron du pois, a permis de reconstruire un arbre phylogénétique de ces peptides (**Chapitre 1**), mettant en évidence quatre sous-familles de BCR, caractérisées par le nombre et l'espacement des cystéines. Tous les pucerons ne possèdent pas nécessairement l'ensemble de ces sous-familles : selon les espèces, on retrouve entre 1 et 13 BCR distincts répartis dans les différentes sous-familles. Chez *A. pisum*, les gènes BCR1, 2, 4, 5, 6, 8 et « new » sont localisés sur un même chromosome [BCR « new » correspond à un nouveau BCR découvert chez *A. pisum* dans l'article Loth *et al*. (2022)]. Parmi eux, les BCR1,2,4,5 et « new »,

Thèse accessible à l'adresse : https://theses.insa-lyon.fr/publication/2025ISAL0089/these.pdf © [H. Terrasson], [2025], INSA Lyon, tous droits réservés

appartenant à la même sous-famille, sont regroupés dans une région de moins de 68 kpb (**Figure 32**). Cette organisation suggère une trajectoire évolutive complexe, marquée par des événements successifs de duplications et de pertes de gènes, pouvant conduire à une diversification fonctionnelle des homologues issus de ces événements de duplication.

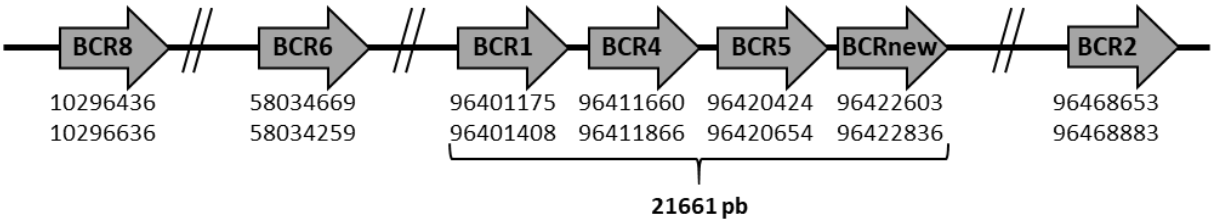


Figure 32 : Répartition des gènes BCR le long du chromosome A1 d'*Acyrthosiphon pisum*. L'orientation des flèches représente le sens de lecture des gènes BCR correspondant. Les chiffres sous les BCR correspondent à l'emplacement du début (haut) et de la fin (bas) de la séquence du gène le long du chromosome exprimé en paires de base (pb). Les gènes BCR1,4,5 et « new » sont concentrés dans une région de seulement 21 661 pb. L'ensemble des BCR de la même sous-famille (BCR1,2,4,5 et « new ») sont compris dans une région de seulement 67 708 pb.

Ce type de duplication n'est pas rare chez les pucerons. En effet, le séquençage du génome du puceron du pois a révélé une abondance de duplications géniques (IAGC, 2010), et des analyses comparatives ont montré que ce phénomène est généralisé chez d'autres pucerons dont le génome a été séquencé plus récemment (Shigenobu et Yorimoto, 2022). Les duplications géniques, fréquentes chez les pucerons, concernent notamment des gènes impliqués dans la symbiose, l'adaptation à la sève phloémienne et la régulation des polymorphismes (formes ailées/aptères, sexuées/asexuées). Elles reflètent alors l'évolution de traits biologiques propres aux pucerons, tels que la reproduction clonale et la relation symbiotique étroite avec *Buchnera*.

Un autre indice de cette diversification fonctionnelle des BCR réside dans leur activité antimicrobienne variable observée *in vitro* : BCR2 présente une activité faible, tandis que BCR1, 3, 5 et 8 possèdent une activité élevée, et BCR4 montre une activité intermédiaire (Uchi *et al.,* 2019). Cette diversité d'activité suggère que certains BCR pourraient être impliqués dans la défense immunitaire, dans la régulation de la symbiose, ou encore qu'ils soient régulés par des voies distinctes, agissant à différents niveaux de contrôle. Ces caractéristiques des BCR rappellent celles des peptides « Nodules-specific Cysteine-Rich » (NCR) des plantes légumineuses. Ces NCR sont des peptides très diversifiés (plus de

Thèse accessible à l'adresse : https://theses.insa-lyon.fr/publication/2025ISAL0089/these.pdf © [H. Terrasson], [2025], INSA Lyon, tous droits réservés

600 NCR identifiés chez *Medicago truncatula*), riches en cystéines et sont exprimés spécifiquement dans les nodules, cellules hôtes spécialisées hébergeant un endosymbiote bactérien acquis *via* le sol, appelé « rhizobium » (*Sinorhizobium meliloti* chez *M. truncatula*) (Mergaert *et al.*, 2003 ; Guefrachi *et al.*, 2014 ; Montiel *et al.*, 2017). Mergaert *et al.* (2003) puis Van de Velde et al, (2010) ont démontré que les NCR étaient directement impliqués dans la régulation de la symbiose en induisant la différenciation des rhizobia en bactérïodes, capables de fixer l'azote atmosphérique (N_2) pour le réduire en ammonium (NH_4^+) utilisable par la plante hôte pour se développer.

Par la suite, il a été montré que les NCR possèdent des localisations et des fonctions variées. Par exemple : (i) NCR169, NCR086 et NCR314 participent à la différenciation des symbiotes (Horváth *et al.*, 2015 ; Saifi et al., 2024) ; (ii) NCR247 bloque la division cellulaire (Farkas *et al.*, 2014) ; (iii) NCR211 est essentiel au maintien et à la survie des bactéroïdes (Kim M. *et al.*, 2015) ; (iv) les peptides cationiques comme NCR055 peuvent altérer la paroi bactérienne et induire la libération partielle du contenu cytoplasmique (Montiel *et al.*, 2017). Enfin, d'autres comme NCR122 ou NCR218 sont exprimés même en l'absence de symbiote et participent à la morphogenèse des nodules (Guefrachi *et al.*, 2014), suggérant un rôle plus indirect dans la symbiose.

La diversification fonctionnelle des BCR fait également écho à celle des CCR (Crypt-specific Cysteine-Rich), exprimés dans les cryptes intestinales de la punaise *Riptortus pedestris* (Futahashi *et al.*, 2013). A ce jour, plus d'une centaine de CCR différents ont été identifiés. Ils ont des activités antimicrobiennes variables (Kim J.K. *et al.*, 2015 ; Lachat *et al.*, 2024), ont des caractéristiques structurales différentes (Futahashi *et al.*, 2013 ; Lachat *et al.*, 2024) et certains sont exprimés de manières constitutives, même en absence de symbiotes (Futahashi *et al.*, 2013).

Ce phénomène de diversification fonctionnelle des AMP se retrouve également chez le charançon *Sitophilus oryzae*, en symbiose avec *Sodalis pierantonius*. Tandis que la coléoptéricine A (un AMP riche en glycine) est exprimée spécifiquement et constitutivement dans les bactériocytes et agit directement sur les symbiotes (Login *et al.*, 2008), son homologue, la coléoptéricine B, n'est exprimée qu'en réponse à une infection, et dans le corps

Thèse accessible à l'adresse : https://theses.insa-lyon.fr/publication/2025ISAL0089/these.pdf © [H. Terrasson], [2025], INSA Lyon, tous droits réservés

gras du charançon (Ferrarini *et al.*, 2022), illustrant son rôle dans la défense immunitaire.

L'ensemble de nos résultats, mis en parallèle avec ces autres exemples d'AMP impliqués dans la régulation symbiotique, suggère que les BCR ont probablement émergé à la suite de duplications géniques, et ont évolué vers des fonctions diversifiées en lien avec la symbiose.

BCR4 : une nouvelle famille structurale et une activité antimicrobienne spécifique

Des études fonctionnelles ont également été menées sur l'un des peptides BCR, le BCR4 issu du puceron du pois. Ce peptide présente un intérêt particulier, car il appartient à la sous-famille de BCR la plus représentée chez *A. pisum* (regroupant également BCR1-2-3 et « BCR-new », un nouveau BCR découvert par Loth *et al.*, 2022). Fait notable, cette sous-famille n'est pas présente chez tous les Aphididae. Elle est retrouvée uniquement chez une fraction de la tribu des Macrosiphini, dont *A. pisum* (**Chapitre 1**).

L'activité antimicrobienne *in vitro* de BCR4 contre la bactérie de forme libre à Gram négatif *Escherichia coli* avait déjà été démontrée précédemment (Uchi *et al.*, 2019). Les mêmes auteurs avaient également montré que, bien que son activité bactéricide soit plus modérée que celle de BCR1, BCR3, BCR5 ou BCR8, BCR4 possède néanmoins la capacité de perméabiliser la membrane des bactéries traitées. Cette combinaison de spécificité phylogénétique et d'activité spécifique fait de BCR4 un candidat particulièrement intéressant à étudier en profondeur.

En collaboration avec le Centre de Biophysique Moléculaire (CBM) d'Orléans, nous avons synthétisé, replié puis résolu la structure tridimensionnelle de BCR4 par résonance magnétique nucléaire (RMN). Cette analyse a révélé que BCR4 constitue, à ce jour, l'unique représentant d'une nouvelle famille structurale de défensine. Comme discuté dans le **Chapitre 1**, les deux familles connues de défensines sont les *trans*- et *cis*-défensines (Shafee *et al.*, 2016, 2017), or la structure de BCR4 ne correspond à aucune d'entre elles. Cette structure inédite renforce l'intérêt d'étudier ce peptide atypique. Des tests

Thèse accessible à l'adresse : https://theses.insa-lyon.fr/publication/2025ISAL0089/these.pdf © [H. Terrasson], [2025], INSA Lyon, tous droits réservés

fonctionnels complémentaires ont confirmé l'activité antimicrobienne *E. coli*, à Gram négatif, mais ont également révélé son absence d'activité contre *Micrococcus luteus*, une bactérie à Gram positif. Ce résultat n'est pas surprenant : les défensines sont en général actives soit contre les bactéries à Gram positif, soit contre celles à Gram négatif mais rarement contre les deux à la fois (Shafee *et al.*, 2017 ; Koehbach, 2017). Dans le contexte biologique du puceron, cette spécificité est particulièrement intéressante pour deux raisons. Premièrement, les pucerons présentent des capacités d'immunité humorale réduites, avec notamment l'absence de la voie IMD, connue pour être impliquée dans la défense contre les bactéries à Gram négatif. Or, BCR4 est un AMP actif contre les bactéries à Gram négatif, dont l'expression semble indépendante de la voie IMD, ce qui n'est pas habituel chez les insectes, où ce type d'activité est généralement associé à cette voie (Lemaitre & Hoffmann, 2007 ; Hanson *et al*., 2019 ; Lilia *et al*., 2024). Ce constat soulève des questions fondamentales sur les mécanismes d'activation des BCR. D'autres voies immunitaires permettent de réguler l'expression d'AMP chez les insectes. Si plusieurs voies immunitaires sont fonctionnelles chez le puceron, notamment les voies JAK/STAT (Zhao *et al.*, 2024 ; Ding *et al.*, 2024), JNK (Renoz *et al.*, 2015 ; Ma *et al.*, 2020, 2025) et Toll (Ma *et al.*, 2025), aucune étude à ce jour n'a exploré leur rôle potentiel dans la régulation des BCR. Il est donc possible que ces peptides soient contrôlés par une voie encore inconnue.

Deuxièmement, la spécificité de BCR4 envers les bactéries à Gram négatif prend tout son sens dans le contexte symbiotique du puceron : *B. aphidicola*, symbiote primaire, ainsi que l'ensemble des symbiotes secondaires (qu'ils soient facultatifs ou co-obligatoires), sont tous des bactéries à Gram négatif (Guo *et al.*, 2017). On peut alors formuler l'hypothèse que les BCR ont évolué pour cibler de manière spécifique ces partenaires microbiens intracellulaires, en jouant un rôle fin de contrôle de la symbiose, plutôt que de défense immunitaire.

BCR4 altère la survie, le développement et la symbiose du puceron

L'activité insecticide de BCR4 a été testée par ingestion chez le puceron du pois (**Chapitres 1 et 2**). De manière intéressante, BCR4 possède une activité

Thèse accessible à l'adresse : https://theses.insa-lyon.fr/publication/2025ISAL0089/these.pdf © [H. Terrasson], [2025], INSA Lyon, tous droits réservés

insecticide dose-dépendante contre *A. pisum*, et perturbe son développement car le traitement a également un impact dose-dépendant sur la masse des survivants.

Afin de mieux comprendre le rôle de BCR4, nous avons ensuite cherché à mieux caractériser les effets de l'ingestion de BCR4 sur la survie, le développement, l'anatomie, les bactériocytes et les symbiotes chez trois lignées d'*A. pisum* : LL01, YR2-*Ri* et YR2-amp. Les résultats montrent deux effets majeurs du traitement au BCR4. Le premier effet majeur est un impact marqué sur la survie, la masse et le développement embryonnaire. Une mortalité dose-dépendante est observé, avec une sensibilité plus forte de la lignée LL01. En comparant YR2-*Ri* (portant *Regiella insecticola*) à YR2-amp (sans symbiote secondaire), on remarque que la présence de *R. insecticola* n'affecte pas la survie, mais accentue la perte de masse, suggérant un coût physiologique, lié à au maintien de ce symbiote (Sochard *et al.*, 2020 ; Man *et al.*, 2023). Les embryons des individus traités sont quant à eux plus petits, moins nombreux et peu développés, indépendamment du génotype du puceron.

Le deuxième effet majeur, est une altération importante des cellules symbiotiques, à la fois morphologique et quantitative. Les bactériocytes maternels sont déformés, comme écrasés entre les organes et semblent moins nombreux. Les expériences de FISH ont montré que le signal de *R. insecticola* apparaît plus faible et fragmenté autour des bactériocytes. Ces altérations s'accompagnent d'une réduction drastique des populations symbiotiques : *B. aphidicola* diminue de 73 à 86 % selon la lignée, tandis que *R. insecticola* chute de 58 %. Pour quantifier ces variations, nous avons utilisé la cytométrie en flux. Contrairement à la quantification par qPCR qui donne une quantification relative du nombre de copies d'un gène de la bactérie par rapport au nombre de copies d'un gène de l'hôte, la cytométrie permet un comptage du nombre absolu de symbiote (**Figure 33**). Cette approche est d'autant plus pertinente que les bactériocytes et leurs symbiotes présentent une forte polyploïdie, comme l'ont montré Nozaki & Shigenobu (2022) pour les cellules hôtes et Komaki & Ishikawa (2000) pour les bactéries. De plus, ces études montrent que le nombre de copies du génome des bactériocytes et des symbiotes varie en fonction du stade de développement. La cytométrie en flux permet de s'affranchir de ce biais possible.

Thèse accessible à l'adresse : https://theses.insa-lyon.fr/publication/2025ISAL0089/these.pdf © [H. Terrasson], [2025], INSA Lyon, tous droits réservés

Comme discuté dans le **Chapitre 2**, l'ensemble de ces résultats amènent à deux hypothèses principales, non mutuellement exclusives, sur le mode d'action de BCR4 qui expliqueraient les phénotypes observés.

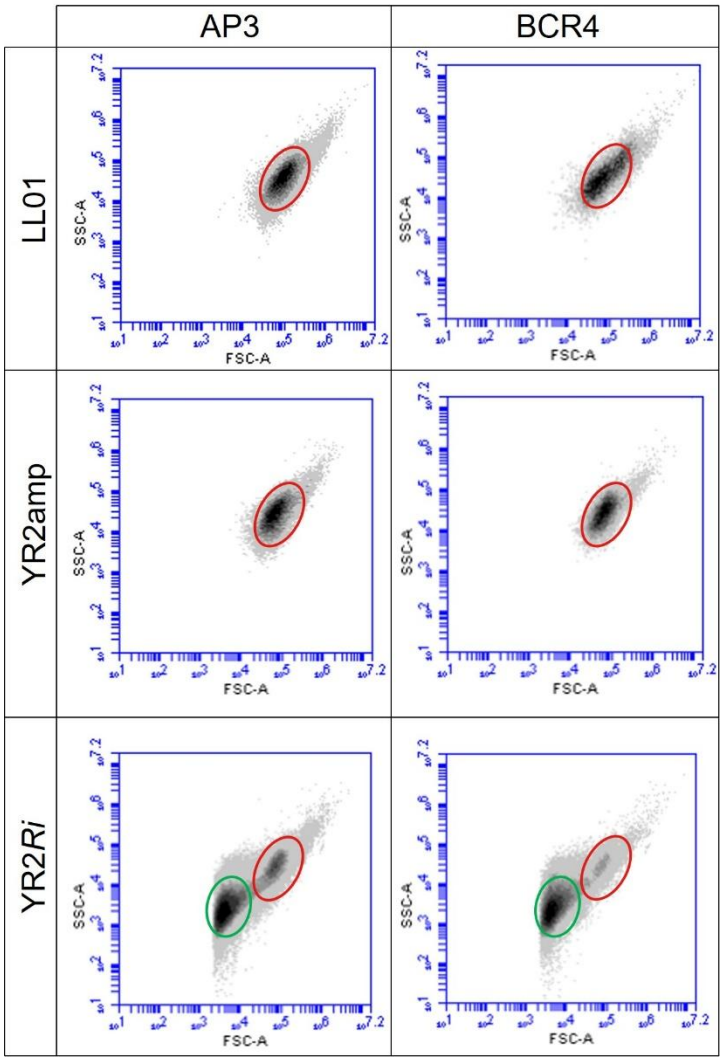


Figure 33 : Identification et dénombrement des symbiotes par cytométrie en flux chez trois lignées d'*Acyrthosiphon pisum*. Les cellules identifiées comme des symbiotes (positives au Syto9) sont représentées sur un diagramme de densité (FSC-A/SSC-A). Chaque point noir correspond à une cellule et le gradient de gris indique une densité croissante de points. La population de *B. aphidicola* (cercle rouge) est définie selon les paramètres décrits par Simonet *et al.* (2016), tandis qu'une seconde population (cercle vert) est observée uniquement dans les lignées YR2-*Ri* et correspond au symbiote secondaire *R. insecticola*.

La première hypothèse est que BCR4 exerce une activité cytotoxique vis-à-vis des cellules hôtes. Cependant, étant donné que le mode d'administration utilisé fut l'ingestion, on s'attendrait à observer un impact au moins sur le tube digestif. Or, aucune altération notable n'a été détectée dans cet organe lors des observations macro- et microscopique. Par ailleurs, d'une manière générale, les bactéries sont sensibles aux AMP, tandis que les cellules eucaryotes ne le sont pas (Zasloff, 2002). Il n'est toutefois pas exclu que certaines lésions échappent à l'observation et ne puissent être détectées qu'à l'aide de techniques plus

Thèse accessible à l'adresse : https://theses.insa-lyon.fr/publication/2025ISAL0089/these.pdf © [H. Terrasson], [2025], INSA Lyon, tous droits réservés

sensibles, telles que la microscopie électronique. La seconde hypothèse est que l'effet du traitement soit dû à une action directe de BCR4 sur les symbiotes, et en particulier sur le symbiote primaire *B. aphidicola*. Cette dernière étant un symbiote strictement obligatoire, son élimination, même partielle, induit une forte réduction de la survie, de la masse, de la fécondité et un ralentissement du développement des pucerons (Douglas, 1992, 1996 ; Wilkinson *et al.*, 1998 ; Nakabachi & Ishikawa, 1999). De nombreuses études ont montré que des molécules administrées par voie orale, y compris des antibiotiques, peuvent atteindre les bactériocytes, même si les mécanismes sous-jacents ne sont pas encore connus. C'est notamment le cas de l'oryzacystatine (**Figure 34a** ; Rahbé *et al.*, 2003) et de la β-glucuronidase (**Figure 34b** ; Cherqui *et al.*, 2003) chez *Myzus persicae* Ces études montrent qu'il est plausible que BCR4 puisse atteindre les bactériocytes puis les symbiotes. Ce transport pourrait être facilité si BCR4 induit une perturbation locale de la membrane des cellules bactériocytaires et du tube digestif, comme peuvent le faire certains AMP (Seyfi *et al.*, 2020) même si notre étude ne permet pas de montrer de tels effets.

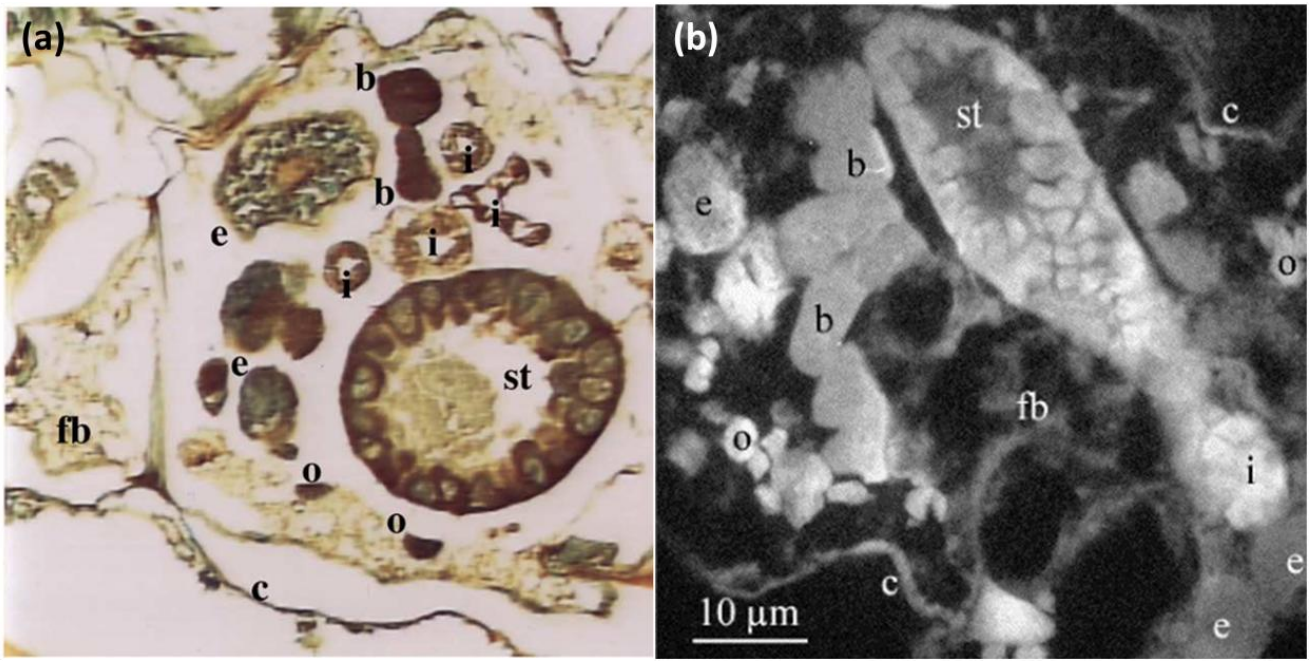


Figure 34 : Détection immuno-histologique de molécule dans les bactériocytes de *Myzus persicae* suite à leur ingestion. (a) Détection immuno-histologique de l'oryzacystatine sur des coupes transversales pucerons adultes élevés sur des plantes de colza exprimant le gène OC-I**.** Une coloration brunâtre à la peroxydase est visible au niveau du tube digestif (st ; i, intestin), des oenocytes (o) et des bactériocytes (b) des pucerons. c = cuticule ; e = embryons ; fb = corps gras. (*d'après Rahbé et al., 2003*). **(b)** Des coupes de pucerons entiers *M. persicae* traités avec un anticorps anti-GUS montrent une fluorescence le long de tout le tube digestif (i : intestin, st : estomac). La coloration est également observée dans les embryons (e), les bactériocytes (b) et les oenocytes (o), et légèrement dans le corps gras (fb) et les cellules épidermiques (c). (*d'après Cherqui et al., 2003*).

Thèse accessible à l'adresse : https://theses.insa-lyon.fr/publication/2025ISAL0089/these.pdf © [H. Terrasson], [2025], INSA Lyon, tous droits réservés

Bien que les études sur l'impact direct de l'ingestion d'AMP chez les insectes soient rares, deux travaux soutiennent cette hypothèse. Luna-Ramirez *et al.* (2017) ont montré que l'ingestion de certains AMP de scorpion chez *A. pisum* entrainait une diminution de la charge symbiotique. De manière similaire, Le-Feuvre *et al.* (2007) ont observé une distorsion voire une dégradation des cellules bactériocytaires suite à l'ingestion d'un AMP bovin chez *Myzus persicae*. Dans les deux cas, les auteurs concluent que les effets insecticides de ces peptides sont probablement dus à des effets bactéricides directs sur les symbiotes.

En examinant plus en détail l'effet du traitement sur les symbiotes, on constate que *Buchnera* est plus sensible que *Regiella*. Cette observation est contre-intuitive : *Regiella insecticola* présente en effet une localisation extracellulaire partielle (dans l'hémolymphe), ce qui aurait pu la rendre plus accessible à BCR4, tandis que *Buchnera*, strictement intracellulaire, aurait pu être protégée par la cellule hôte. Or, nos résultats montrent l'inverse, soulevant la question de la sensibilité différentielle des deux symbiotes.

Cette sensibilité accrue de *Buchnera* pourrait s'expliquer par sa perte de la capacité à produire et incorporer des lipopolysaccharides (LPS) dans sa membrane externe (Charles *et al.*, 2011), un composant essentiel de la résistance aux AMP chez les bactéries à Gram négatif (Rosenfeld & Shai, 2006 ; Ebbensgaard *et al.*, 2018). À l'inverse, *Regiella* serait régulée principalement par d'autres composantes de la réponse humorale et cellulaire de l'hôte, comme le suggèrent (i) les résultats de Schmitz *et al.* (2012), qui ont mis en évidence la réponse phagocytaire des hémocytes contre ce symbiote et (ii) les résultats de Luo *et al.* (2022) qui montrent que la présence de *Regiella* module l'activité phénoloxidase et d'encapsulation de l'hôte. Ces observations complètent celles de Gerardo *et al.* (2010) et de Laughton *et al.* (2011) qui n'ont pas détecté d'AMP dans l'hémolymphe des pucerons après infection bactérienne par *E. coli*. Ensemble, ces résultats suggèrent que BCR4 n'interviendrait pas dans la régulation des bactéries extracellulaires, qu'elles soient symbiotiques ou non, mais jouerait plutôt un rôle intracellulaire ciblé, dans les bactériocytes. Dans ce contexte, il serait intéressant d'étudier les effets de l'ingestion de BCR4 chez des lignées de pucerons portant des symbiotes secondaires ou co-obligatoires localisés exclusivement dans des bactériocytes secondaires. Une diminution de

Thèse accessible à l'adresse : https://theses.insa-lyon.fr/publication/2025ISAL0089/these.pdf © [H. Terrasson], [2025], INSA Lyon, tous droits réservés

la quantité de symbiotes comparable à celle observée pour *Buchnera* viendrait appuyer cette hypothèse.

En résumé, l'ensemble des résultats présentés dans les Chapitres 1 et 2 de cette thèse soutient l'hypothèse selon laquelle le BCR4 ingéré exerce une activité bactéricide in vivo *contre* B. aphidicola*, contribuant ainsi, au moins en partie, à son effet insecticide. Afin de comprendre si BCR4 est bien impliqué dans le contrôle de cette bactérie symbiotique, nous avons ensuite étudié le peptide BCR4 endogène,* e.g. *produit par le puceron du pois. Et une étape cruciale permettant de mieux comprendre le rôle d'une protéine est de caractériser sa localisation tissulaire et subcellulaire.*

Confirmation de la présence de BCR4 par spectrométrie de masse

Après que Shigenobu & Stern (2013) aient décrit l'expression « bacteriocyte-specific » des ARN messager codant les BCR, il était nécessaire de (i) prouver l'existence des protéines traduites et (ii) caractériser leur localisation spatio-temporelle. Dans la majorité des cas, les AMP produits dans les différentes cellules des insectes sont sécrétés hors de la cellule, vers l'hémolymphe pour y exercer leur fonction immunitaire de défense antimicrobienne (Yu *et al.*, 2022), ou dans la lumière du tube digestif afin de réguler les populations bactériennes qui composent le microbiote intestinal (Buchon *et al.*, 2013a ; Marra *et al.*, 2021 ; Lachat *et al.*, 2024). Ainsi, la persistance de BCR dans les bactériocytes, en absence d'infection, renforcerait l'hypothèse de l'implication de ces peptides dans la symbiose.

Pour tester cette hypothèse, nous avons développé le premier anticorps à ce jour spécifique des BCR, en produisant un anticorps anti-BCR4. Cet outil nous a permis (i) de confirmer la présence du peptide endogène chez le puceron du pois par spectrométrie de masse ; (ii) de détecter sa présence dans le cytoplasme des bactériocytes et (iii) de caractériser sa localisation subcellulaire au cours du développement du puceron, en la comparant avec celle de marqueurs connus de deux compartiments cellulaires : le réticulum endoplasmique et les microtubules. (**Chapitre 3**)

Thèse accessible à l'adresse : https://theses.insa-lyon.fr/publication/2025ISAL0089/these.pdf © [H. Terrasson], [2025], INSA Lyon, tous droits réservés

L'analyse par spectrométrie de masse a permis, pour la première fois, de démontrer la présence effective d'un peptide BCR chez le puceron, confirmant que les ARNm détectés par Shigenobu & Stern (2013) sont bien traduits en protéines. Cela contredit l'annotation du génome d'*A. pisum* disponible sur la base de données NCBI qui qualifie le gène BCR4 (symbole NV4 : https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/100302493) d'ARN non-codant. De manière surprenante, lors de la détection du peptide natif à partir d'extraits protéiques bactériocytaire en western blot, nous avons détecté la présence de BCR4 à une taille inattendue, autour de 30 kDa au lieu des 5,9 kDa attendus. Des modifications post-traductionnelles (MPT) impliquant des liaisons covalentes pourraient expliquer cette taille (Hermann *et al.*, 2022). Les MPT impliquant un tel décalage de taille attendue en western blot incluent, entre-autre, l'urmylation (ajout d'une ou plusieurs « ubiquitin-related modifier 1 » d'environ 15 kDa ; Ravichandran *et al.*, 2022), l'ubiquitination (ajout d'une ou plusieurs ubiquitines d'environ 8,5 kDa ; De Silva & Page, 2023) ou encore la sumoylation (ajout d'une ou plusieurs protéines SUMO d'entre 10-20 kDa ; Tatham *et al.*, 2009). Ces MTP régulent l'activité des protéines en modulant leur localisation, stabilité, dégradation et/ou traduction. Des études dédiées à l'identifications des MTP seront nécessaires pour confirmer si BCR4 subit effectivement des MTP ce qui suggèrerait une régulation post-traductionnelle de la protéine permettant de moduler sa localisation, son activité et/ou sa quantité. Sachant que le BCR4 synthétique a tendance à former des polymères en western blot (**Figure 25**), une autre possibilité est que BCR4 forme des polymères impliquant précisément cinq peptides dans les bactériocytes (5 x 5,9 ≈ 30 kDa), lui permettant d'accomplir une fonction particulière.

Localisation subcellulaire de BCR4 dans les bactériocytes : une proximité étroite avec *B. aphidicola*

Après avoir confirmé sa présence, nous avons cherché à caractériser la localisation subcellulaire de BCR4 au sein des bactériocytes du puceron du pois en fonction du stade développement. Nos observations montrent que BCR4 est présent dans tous les bactériocytes, quelques soit le stade examiné. Comme présenté dans le **Chapitre 3**, le co-immunomarquage BCR4/GroEL révèle que BCR4 forme un maillage continu dans tout le cytoplasme du bactériocyte, autour

Thèse accessible à l'adresse : https://theses.insa-lyon.fr/publication/2025ISAL0089/these.pdf © [H. Terrasson], [2025], INSA Lyon, tous droits réservés

des bactéries, aux stades nymphaux et jeunes adultes. Cette localisation rappelle celle de certains NCR, impliqués dans la différenciation des bactéries symbiotiques, chez la légumineuse *M. truncatula*. En utilisant la méthode de transformation racinaire (i.e. intégration d'un ADN étranger (T-DNA) dans les racines de *M. truncatula* permettant l'expression de gènes NCR fusionnés à une protéine fluorescente), plusieurs NCR tels que NCR169 (Horváth *et al.*, 2015), NCR-new35 (Horváth *et al.*, 2023) et NCR343 (Zhang *et al.*, 2023) ont été localisés autour des bactéries symbiotiques, dans l'espace péribactéroïdien (espace situé entre la bactérie et la membrane symbiosomale). De manière similaire, la coléoptéricine A impliquée dans la régulation des symbiotes chez le charançon, est en partie localisée à la périphérie des bactéries symbiotiques (Login *et al.*, 2008).

Sans pouvoir extrapoler les fonctions précises de BCR4, sa présence stable autour des symbiotes tout au long du développement suggère un rôle potentiel dans leur contrôle, leur maintien ou leur différenciation.

En plus de ce marquage diffus, le signal BCR4 forme également des « spots » fluorescents plus intenses, répartis de manière hétérogène dans la cellule. Ce type de signal rappelle fortement les « puncta » (points fluorescents) observés lors du transport de protéines, dont des peptides antimicrobiens comme la drosomycine chez la drosophile (Shandala *et al.*, 2011), *via* la voie de sécrétion (Tsuzuki *et al.*, 2022 ; Glashauser *et al.*, 2023). Par analogie, ces points formés par BCR4 pourraient correspondre au peptide en cours de transport, confiné dans une vésicule. Le fait que ces « puncta » soient observés entre les bactéries va dans le sens de cette hypothèse.

Relations entre le réticulum endoplasmique et BCR4

Au cours de nos observations, la localisation de BCR4 autour des bactéries nous est apparue familière, rappelant l'organisation originale du RE dans les bactériocytes (Simonet *et al.*, 2018 ; Introduction Partie 4.2). Des co-immunomarquages avec des anticorps dirigés contre KDEL et BCR4 ont confirmé une colocalisation partielle entre les deux signaux. Cette observation est cohérente avec le fait que BCR4 possède un peptide signal, ce qui impliquerait qu'il emprunte la voie de sécrétion / du transport vésiculaire en transitant par le RE. Simonet *et al.* (2018) suggèrent que cette organisation

Thèse accessible à l'adresse : https://theses.insa-lyon.fr/publication/2025ISAL0089/these.pdf © [H. Terrasson], [2025], INSA Lyon, tous droits réservés

atypique du RE permet de (i) garantir ses fonctions de biosynthèse et de transport dans toute la cellule malgré la présence abondante des symbiotes, et (ii) de conférer un avantage métabolique aux bactéries symbiotiques *B. aphidicola*, qui dépendent du métabolisme de l'hôte pour la biosynthèse d'acides aminés. Il est donc plausible que cette proximité du RE permette également de faciliter le transport ciblé d'autres composés, comme BCR4, à travers la membrane symbiosomale vers *Buchnera* (Griffiths & Beck, 1975 ; Houk & Griggiths, 1980 ; Shigenobu & Stern, 2013).

Ce type de transport vésiculaire, qui adresserait BCR4 vers la membrane symbiosomale est typiquement ce qui est observé pour les NCR (Van de Velde *et al.*, 2010 ; Wang *et al.*, 2010). Une autre étude qui va dans ce sens est celle de Nakabachi *et al.* (2014) ayant démontré que chez le puceron, un gène codé par l'hôte, RlpA4, était capable de traverser la membrane symbiosomale et de cibler *B. aphidicola* dans les bactériocytes, et participerait au métabolisme de synthèse de la paroi cellulaire de la bactérie (Smith *et al.*, 2020). Comme BCR4, RlpA4 contient un peptide signal d'adressage au RE. Si on ajoute l'observation de « puncta » formés par BCR4 entre les bactéries symbiotiques, tous ces éléments convergent vers l'hypothèse que BCR4 suit bien la voie vésiculaire avec une première étape d'adressage vers le RE grâce à son peptide signal, puis transport vers la membrane symbiosomale (et *B. aphidicola*).

Il est important de noter que l'organisation de BCR4 ne suit pas pour autant parfaitement celle du RE. En plus des « puncta » spécifiques à BCR4 mentionnés précédemment, le maillage formé par BCR4 apparaît plus lisse et continu autour des bactéries que le réseau réticulé formé par le RE. De plus, cette différence est particulièrement marquée dans les bactériocytes de pucerons plus âgés, voire sénescents (A23 et A35). À ces stades, le cytoplasme des bactériocytes n'est plus entièrement rempli de bactéries. On observe alors de larges zones à faible densité symbiotique, en réalité remplies par une accumulation de vacuoles acides issues du RE (Simonet *et al.*, 2018). Nos co-marquages avec des anticorps anti-BCR4 et anti-KDEL montrent, qu'à la périphérie des bactériocytes âgés, là où des bactéries sont encore présentes, BCR4 et KDEL s'organisent selon le même maillage observé aux stades plus jeunes. En revanche, au centre des bactériocytes, on observe bien les vacuoles formées par le RE, mais plus aucun maillage de BCR4 n'est visible. Ainsi, BCR4

Thèse accessible à l'adresse : https://theses.insa-lyon.fr/publication/2025ISAL0089/these.pdf © [H. Terrasson], [2025], INSA Lyon, tous droits réservés

n'accompagne le RE que dans les zones contenant des symbiotes, ce qui renforce encore l'hypothèse d'une fonction directement liée à *Buchnera*, et non simplement à l'architecture endomembranaire générale.

Relations entre BCR4, le cytosquelette et les « sheat cells »

Enfin, au cours de cette étude, nous avons réalisé des co-marquages entre BCR4 et le réseau de microtubules qui constitue le cytosquelette du bactériocyte. Ce réseau est particulièrement développé dans l'ensemble du bactériocyte (Simonet *et al.*, 2018). Nos images montrent que les « puncta » formés par le signal BCR4 semblent presque toujours situés à proximité d'un microtubule, même dans les zones à faible densité symbiotique. Cette proximité supporte l'hypothèse que BCR4 pourrait être transporté au travers des différents compartiments endomembranaires de la cellule par le trafic vésiculaire : le réseau de microtubules constitue en effet les rails du transport vésiculaires (Fourriere *et al.*, 2020). Je reste cependant prudent quant à cette interprétation. En effet, le cytosquelette est tellement développé dans l'ensemble du cytoplasme que, même s'il n'existe aucun lien direct entre BCR4 et ces vésicules, la probabilité d'observer une proximité entre les « puncta » de BCR4 et les microtubules est très élevée. Il est donc possible que cette co-localisation soit fortuite, sans lien fonctionnel direct. Seuls des marquages ciblant spécifiquement les différents compartiments endomembranaires et les vésicules de transport pourraient permettre de valider cette hypothèse.

Cette expérience révèle également une différence importante : le cytosquelette ne forme pas le même maillage organisé autour des bactéries que celui observé pour BCR4 ou pour le RE. Cela démontre que tous les éléments du cytosol ne partagent pas la même architecture spatiale, et que la localisation précise de BCR4 ne résulte pas simplement d'une contrainte cellulaire générale, mais reflète probablement une fonction ciblée.

Enfin, le marquage du cytosquelette permet de mettre en évidence les « sheath cells » (SC) qui sont retrouvées accolées à certains bactériocytes (**Figure 35**). L'expérience d'hybridation *in situ* menée par Shigenobu & Stern (2013) suggère que les ARN messagers codant les BCR ne sont pas exprimés dans les SC. Néanmoins, à la vue de leurs images, cette absence d'expression est difficile à affirmer avec certitude. A l'opposé, nous sommes assez confiants en

Thèse accessible à l'adresse : https://theses.insa-lyon.fr/publication/2025ISAL0089/these.pdf © [H. Terrasson], [2025], INSA Lyon, tous droits réservés

nos résultats car, dans nos expérience d'immunolocalisation, les SC sont toujours entièrement remplies d'un signal très intense et homogène de BCR4. A ce jour, le rôle des SC reste inconnu. On sait qu'elles n'hébergent pas *B. aphidicola* mais qu'elles peuvent accueillir certains symbiotes secondaires comme *R. insecticola* ou *S. symbiotica* (Tshuchida *et al.*, 2005 ; Koga *et al.*, 2012).

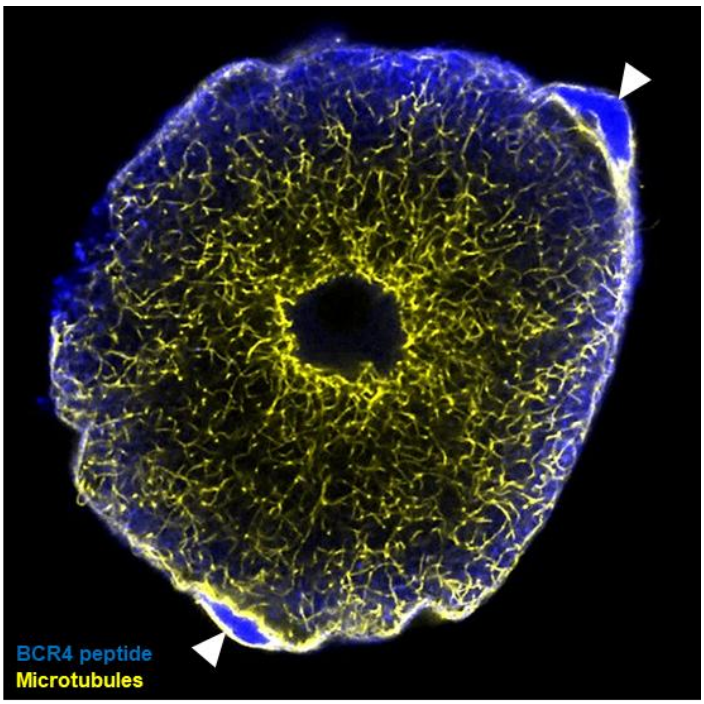


Figure 35 : Présence de BCR4 dans les sheath cells d'un bactériocycte d'*Acythosiphon pisum*. Observation d'un bactériocyte de puceron du pois, A9 isolé et co-immunomarqué avec un anticorps anti-β-tubuline (cytosquelette ; en jaune) et anti-BCR4 (en bleu). Les têtes de flèches blanches pointent des renflements du cytosquelette formés à la périphérie du bactériocytes correspondant à des « sheath cells ». Ces renflements sont totalement remplis par un marquage BCR4.

Sans plus d'information, la présence de BCR4 dans ces cellules est donc difficile à interpréter. Plusieurs hypothèses peuvent être envisagées :

- S'agit-il d'une forme de stockage du peptide BCR4 dans ces cellules, servant de réservoir mobilisable selon les besoins ?
- Les SC pourraient-elles agir comme une barrière protectrice contre l'invasion de pathogènes, et la forte concentration de BCR4 y jouerait alors un rôle préventif en renforçant leur immunité ?
- BCR4 pourrait-il empêcher la colonisation des SC par *Buchnera aphidicola*, dont la présence pourrait être délétère pour le bon fonctionnement de ces cellules ?

Cette dernière hypothèse est particulièrement intéressante à la lumière des résultats présentés au **Chapitre 2**. En effet, nous avons observé que le symbiote secondaire *R. insecticola* est moins sensible à BCR4 que *B. aphidicola*,

Thèse accessible à l'adresse : https://theses.insa-lyon.fr/publication/2025ISAL0089/these.pdf © [H. Terrasson], [2025], INSA Lyon, tous droits réservés

et reste présente dans les SC après ingestion du peptide. Il est donc envisageable que BCR4 empêche spécifiquement l'installation du symbiote primaire dans les « sheath cells », tout en permettant à des symbiotes secondaires, moins sensibles, de s'y établir. Dans ce contexte, il serait particulièrement pertinent de vérifier si BCR4 est toujours présent dans les SC, y compris dans les lignées hébergeant un symbiote secondaire. Une telle observation viendrait renforcer l'idée que BCR4 joue un rôle de régulateur spatial de la symbiose, contribuant à la compartimentation fonctionnelle des différents types de symbiotes dans des cellules hôtes spécialisées. À ce jour, cette hypothèse reste difficile à vérifier en raison de l'absence d'anticorps spécifiquement dirigés contre les symbiotes secondaires.

BCR4, voie d'adressage et rôle possible

En résumé, cette discussion générale permet d'affiner les hypothèses concernant le rôle de BCR4. Sa structure, son activité antimicrobienne *in vitro*, ainsi que son expression et sa localisation dans les bactériocytes suggèrent une implication dans la symbiose, *via* une action directe sur les symbiotes, à l'instar d'autres familles de peptides antimicrobiens décrits dans divers systèmes symbiotiques. Cette action directe sur les symbiotes est étayée par la présence d'un peptide signal, par la proximité observée entre BCR4 et le réticulum endoplasmique (RE) des bactériocytes ainsi que par présence de « puncta » associés au cytosquelette qui suggèrent un transport vésiculaire potentiel du peptide. L'ensemble de ces éléments soutient l'idée que BCR4 pourrait être traduit dans le RE, y être replié, puis être acheminé *via* le trafic vésiculaire vers la membrane symbiosomale, afin de rejoindre l'espace périsymbiotique et d'agir directement sur *Buchnera*, à l'image des NCR chez les légumineuses (Wang *et al.*, 2010) (**Figure 36a**). Un passage par l'appareil de Golgi dans ce processus n'est pas à exclure, cette voie jouant généralement un rôle dans le tri et l'acheminement des peptides vers leur destination finale dans la cellule, même si elle n'est pas systématiquement empruntée (Rabouille, 2017). Chez les légumineuses, les NCR sont spécifiquement dirigés vers la membrane symbiosomale grâce à un système d'adressage propre aux cellules nodulaires infectées, ainsi qu'à une composition de la membrane symbiosomale bien définie, distincte de celle des autres compartiments cellulaires (Stonoha-Arther

Thèse accessible à l'adresse : https://theses.insa-lyon.fr/publication/2025ISAL0089/these.pdf © [H. Terrasson], [2025], INSA Lyon, tous droits réservés

& Wang, 2018). BCR4 pourrait ainsi emprunter un mécanisme similaire pour atteindre *Buchnera*.

Une fois le symbiote atteint, plusieurs hypothèses peuvent être envisagées quant au rôle exact de BCR4 (**Figure 36b**).

- Premièrement, son activité bactéricide observée *in vitro*, ainsi que son impact sur la quantité de symbiotes après ingestion, suggèrent que BCR4 pourrait participer à la régulation de la densité symbiotique *via* une action bactéricide *in vivo*. Cette possibilité ne peut être écartée, bien que certains éléments plaident en sa défaveur. En effet, les BCR sont exprimés dès les stades embryonnaires et sont présents dans les bactériocytes des pucerons aux stades nymphaux, période durant laquelle la croissance de *Buchnera* est exponentielle. Par ailleurs, d'autres peptides similaires tels que les NCR, les CCR ou encore ColA présentent également une activité bactéricide *in vitro*, sans qu'une telle fonction ait été démontrée *in vivo*. Ainsi, un rôle exclusivement « symbiont-killing » pour BCR4 demeure envisageable, mais à mon sens, peu probable.
- En revanche, BCR4 pourrait réguler la quantité de *Buchnera* non pas par une action bactéricide directe, mais en ciblant des protéines intracytoplasmiques, limitant ainsi ses capacités de division sans altérer sa capacité de réplication de l'ADN ni ses fonctions métaboliques. Ce mode d'action a été décrit pour certains des peptides nommés plus haut (NCR ou ColA), qui sont capables d'inhiber la division cellulaire des symbiotes induisant la formation de bactéries géantes, polyploïdes et métaboliquement actives (Van de Velde et al., 2010 ; Login et al., 2011). Cette hypothèse semble d'autant plus plausible que *Buchnera* est naturellement très polyploïde dans les bactériocytes, avec un génome pouvant atteindre plusieurs centaines de copies par cellule (Komaki & Ishikawa, 2000).
- A côté d'un rôle dans le contrôle des symbiotes, les résultats obtenus au cours de cette thèse n'excluent pas que BCR4 puisse exercer d'autres rôle dans la symbiose. Une hypothèse séduisante a été proposée par Mergeart *et al.* (2017) dans un « opinion paper » publié dans la revue *Trends in Microbiology*. Ces auteurs suggèrent que, BCR4 pourrait fonctionner comme un facilitateur des échanges métaboliques entre les symbiotes et les cellules de l'hôte. Cette

Thèse accessible à l'adresse : https://theses.insa-lyon.fr/publication/2025ISAL0089/these.pdf © [H. Terrasson], [2025], INSA Lyon, tous droits réservés

action se réaliserait *via* la perméabilisation de la membrane bactérienne. Un tel rôle de facilitateur d'échanges *via* perméabilisation réversible de la membrane bactérienne a déjà suggéré dans d'autres systèmes, par exemple : (i) le peptide Ag5, produit par l'aulne, peut interagir avec la membrane du symbiote *Frankia* et, à des doses sublétales, induire la libération de glutamine et d'acide glutamique sans affecter sa respiration ou sa capacité de fixation de l'azote (Carro *et al.*, 2015) ; (ii) certains peptides NCR des légumineuses sont capables de perméabiliser la membrane des rhizobia *in vitro* et sont présumés contribuer aux échanges métaboliques avec l'hôte *in vivo* (Mergeart *et al.*, 2017) ; (iii) de manière plus générale, de nombreux AMP sont connus pour former des pores transitoires et réversibles dans les membranes lipidiques causant des fuites partielles de contenu sans entraîner une déstabilisation complète (Hristova *et al.*, 1997 ; Wimley, 2010 ; Rice *et al.*, 2025). Une telle fonction facilitatrice des échanges pourrait être particulièrement pertinente dans le contexte de la symbiose entre *Buchnera* et le puceron. Le génome de *Buchnera*, fortement réduit, est dépourvu de nombreux gènes codant pour des transporteurs d'acides aminés ou de précurseurs métaboliques (Charles *et al.,* 2011), ce qui est paradoxal compte tenu de son rôle central dans la biosynthèse des acides aminés essentiels pour son hôte. Dans ce contexte, BCR4 (et potentiellement les autres BCR) pourrait favoriser les échanges en perméabilisant de manière transitoire la membrane bactérienne, permettant ainsi la libération passive de certains nutriments sans provoquer de lyse. À terme, une perméabilisation prolongée, et/ou une concentration de peptide trop élevée, pourraient toutefois conduire à une déstabilisation irréversible de la membrane, puis à la mort du symbiote, suivie de sa prise en charge par le système lysosomial de la cellule hôte, comme observé par Simonet *et al.* (2018).

Il est important de souligner que ces différentes hypothèses ne sont pas nécessairement exclusives et pourraient refléter la pluralité des fonctions que BCR4 est susceptible d'exercer selon le contexte développemental ou physiologique. Par ailleurs, bien que mes travaux se concentrent principalement sur BCR4, il existe sept autres peptides BCR identifiés chez le puceron du pois. Une action concertée ou complémentaire entre plusieurs de ces peptides pourrait

Thèse accessible à l'adresse : https://theses.insa-lyon.fr/publication/2025ISAL0089/these.pdf © [H. Terrasson], [2025], INSA Lyon, tous droits réservés

renforcer ou moduler l'impact de chacun, et devra être explorée dans de futurs travaux.

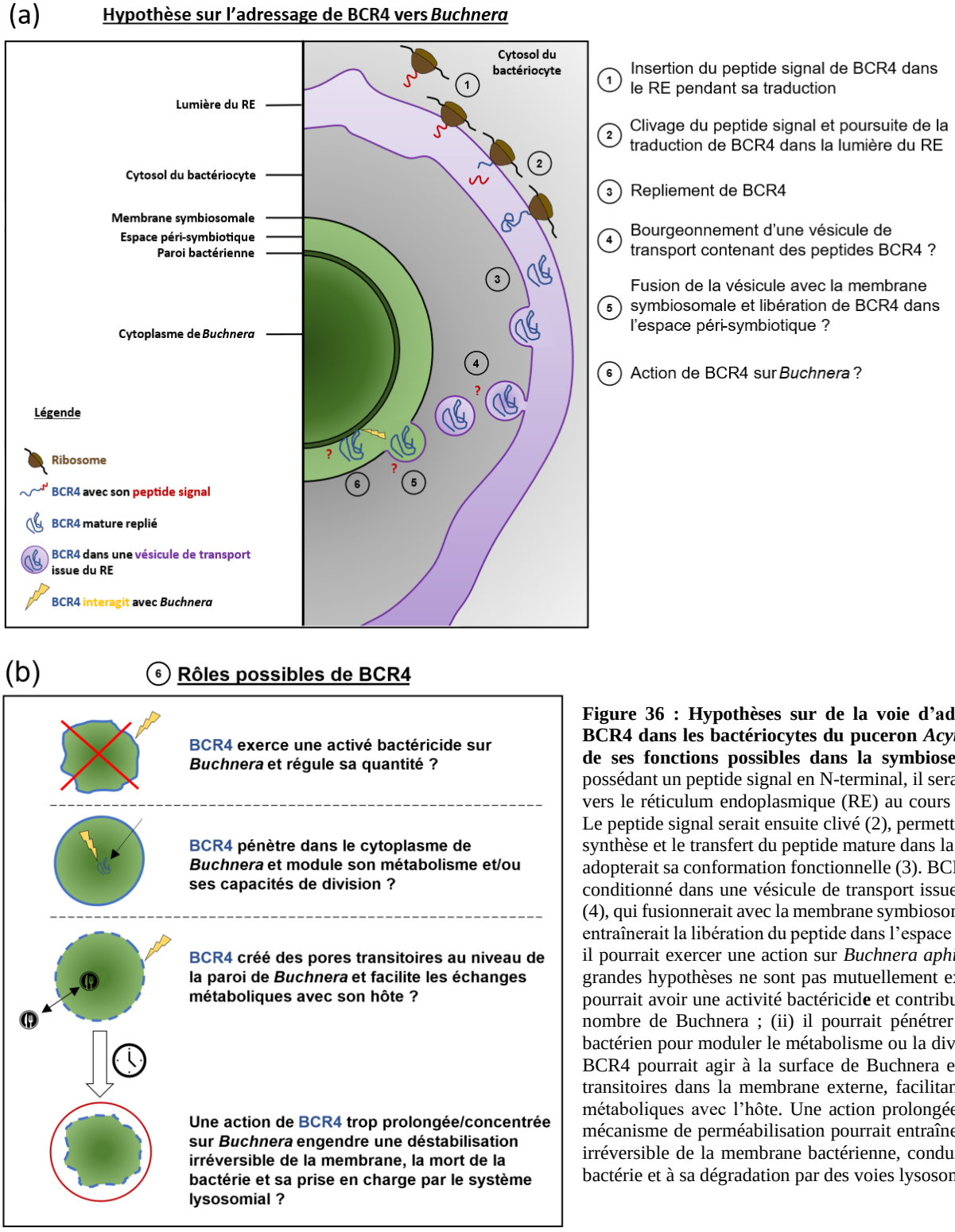


Figure 36 : Hypothèses sur de la voie d'adressage du peptide BCR4 dans les bactériocytes du puceron *Acyrthosiphon pisum* et de ses fonctions possibles dans la symbiose. Le peptide BCR4 possédant un peptide signal en N-terminal, il serait initialement dirigé vers le réticulum endoplasmique (RE) au cours de sa traduction (1). Le peptide signal serait ensuite clivé (2), permettant la poursuite de la synthèse et le transfert du peptide mature dans la lumière du RE, où il adopterait sa conformation fonctionnelle (3). BCR4 pourrait alors être conditionné dans une vésicule de transport issue du RE ou du Golgi (4), qui fusionnerait avec la membrane symbiosomale (5). Cette fusion entraînerait la libération du peptide dans l'espace péri-symbiotique, où il pourrait exercer une action sur *Buchnera aphidicola* (6). **(b)** Trois grandes hypothèses ne sont pas mutuellement exclusives : (i) BCR4 pourrait avoir une activité bactéricid**e** et contribuer à la régulation du nombre de Buchnera ; (ii) il pourrait pénétrer dans le cytoplasme bactérien pour moduler le métabolisme ou la division cellulaire ; (iii) BCR4 pourrait agir à la surface de Buchnera en formant des pores transitoires dans la membrane externe, facilitant ainsi les échanges métaboliques avec l'hôte. Une action prolongée ou excessive de ce mécanisme de perméabilisation pourrait entraîner une déstabilisation irréversible de la membrane bactérienne, conduisant à la mort de la bactérie et à sa dégradation par des voies lysosomales.

Thèse accessible à l'adresse : https://theses.insa-lyon.fr/publication/2025ISAL0089/these.pdf © [H. Terrasson], [2025], INSA Lyon, tous droits réservés

Thèse accessible à l'adresse : https://theses.insa-lyon.fr/publication/2025ISAL0089/these.pdf © [H. Terrasson], [2025], INSA Lyon, tous droits réservés

CONCLUSION ET PERSPECTIVES

En conclusion, cette thèse apporte des avancées significatives à la compréhension du rôle des peptides BCR et, en particulier, de BCR4, dans la symbiose chez le puceron du pois. S'inscrivant dans la continuité des travaux initiés par Shigenobu & Stern en 2013, elle a permis de confirmer certaines de leurs hypothèses tout en en formulant de nouvelles. D'une part, l'étude phylogénétique et structurale a révélé une diversification des BCR restreinte aux Aphididae démontrant l'évolution de cette famille de peptides avec les pucerons en lien avec leur symbiote primaire, *Buchnera aphidicola*. D'autre part, l'étude approfondie du peptide BCR4 a permis de démontrer son originalité structurale et son activité bactéricide spécifique contre les bactéries à Gram négatif, suggérant qu'il pourrait agir comme défensine contrôlant l'hyperprolifération des symbiotes dans le bactériocyte. Les expérimentations d'administration *in vivo* de BCR4 ont montré que ce peptide altère la survie, le développement embryonnaire et le nombre de symbiotes, avec un effet plus important sur le symbiote primaire que sur un symbiote facultatif supportant encore un peu plus l'hypothèse de sa potentielle implication dans la régulation de la symbiose primaire chez le puceron du pois. Enfin, j'ai pu démontrer, pour la première fois, que BCR4 est effectivement exprimé sous forme de peptide, et vraisemblablement en grande quantité dans certains stades de vie, dans les bactériocytes de pucerons. L'identification précise de sa localisation subcellulaire dans les bactériocytes, sa proximité avec *B. aphidicola,* et ses interactions possibles avec le réticulum endoplasmique soulignent son intégration dans un réseau complexe d'interactions intracellulaires. L'ensemble de ces résultats met en lumière le rôle central des BCR dans la dynamique symbiotique et ouvre de nouvelles perspectives pour comprendre la régulation des symbiotes intracellulaires chez les insectes.

Un rôle dans l'immunité ?

La confirmation de la présence de défensines chez le puceron soulève la question de leur possible implication dans l'immunité contre les bactéries pathogènes. Jusqu'à présent, les études précédentes n'ont pas permis de détecter la présence d'AMP par HPLC (Gerardo *et al.*, 2010) ni d'activité

Thèse accessible à l'adresse : https://theses.insa-lyon.fr/publication/2025ISAL0089/these.pdf © [H. Terrasson], [2025], INSA Lyon, tous droits réservés

antimicrobienne de l'hémolymphe suite à des challenges immunitaires (Laugthon *et al.*, 2011). Par comparaison, suite à un challenge immunitaire, l'hémolymphe de *Tenebrio molitor* possède une activité bactéricide (Laughton *et al.*, 2011) et l'analyse HPLC de l'hémolymphe de *Sitophilus oryzae* révèle au moins cinq pics d'induction bien distincts (Gerardo *et al.*, 2010). Ces résultats traduisent la présence effective d'AMP dans l'hémolymphe de ces insectes. L'absence d'AMP dans le répertoire génomique des pucerons a par ailleurs été démontrée dans le génome du puceron du pois initialement (IAGC 2010, Gerardo *et al.*, 2010) et dans les autres génomes de pucerons séquencés depuis. Cependant, Gerardo *et al.* (2010) mentionnent la présence de « pics » en HPLC correspondant à des petits peptides dans l'hémolymphe d'*A. pisum* soumis à un challenge par une bactérie à Gram positif comparé à l'hémolymphe des pucerons témoins. A ma connaissance, ces signaux n'ont pas été explorés plus spécifiquement depuis la publication de cette étude. A mon sens, il est aujourd'hui nécessaire de vérifier si ces pics correspondent à des BCR, et de mesurer une potentielle surexpression de tout ou partie des gènes BCR suite à une infection bactérienne avant d'affirmer leur non-implication dans l'immunité.

Des expériences ciblées de qRT-PCR ou des approches globales comme le RNA-sequencing (RNA-seq) permettraient de répondre à ces questions. Il conviendra toutefois d'adapter les méthodes pour assurer la détection des ARNm de petite taille (les séquences codantes des BCR étant très courtes, inférieures à 200 pb) et très similaires au sein d'une même famille.

Expériences d'inactivations fonctionnelles des BCR

Parmi les approches expérimentales à développer, l'application de l'approche d'interférence par ARN (ARNi) représente une stratégie prometteuse pour tester le rôle fonctionnel des BCR. Elle consiste à administrer un petit ARN double brin (dsRNA) complémentaire d'un ARNm cible, afin d'en inhiber l'expression (Koo & Palli, 2024).

Des essais d'ARNi ciblant différents BCR ont été amorcés au cours de cette thèse, mais n'ont pas donné lieu à des résultats concluants à ce stade, en raison de l'absence d'effet phénotypique et d'extinction de l'expression des gènes détectables. Cette inefficacité peut s'expliquer par : la dégradation rapide des dsRNA dans l'hémolymphe ou la salive des pucerons (Christiaens *et al.*,

Thèse accessible à l'adresse : https://theses.insa-lyon.fr/publication/2025ISAL0089/these.pdf © [H. Terrasson], [2025], INSA Lyon, tous droits réservés

2014) ou une potentielle redondance fonctionnelle entre les BCR, rendant l'inactivation d'un seul peptide insuffisante pour induire un effet observable. Par ailleurs, des travaux précédents réalisés dans notre laboratoire, ont démontré la difficulté de l'approche RNAi chez le puceron du pois, qui a un effet non systémique, avec des effets phénotypiques qui sont gène-spécifique et tissu-spécifique (Sapountzis *et al.*, 2014).

Des méthodes améliorées d'administration, comme la transfection des dsRNA dans des vésicules avant ingestion (technique validée chez *A. pisum* par Ligonière *et al.*, 2023), pourraient permettre de surmonter ces obstacles. Par ailleurs, le développement récent de la technologie CRISPR-Cas9 chez le puceron (Le Trionnaire *et al.*, 2019 ; Shigenobu *et al.*, 2025) ouvre la voie à une édition génétique stable et ciblée pour tester le rôle des BCR *in vivo*.

Quels sont les protéines partenaires des BCR ?

Comme le montre le **Chapitre 3**, chez le puceron du pois, BCR4 est localisé à proximité immédiate du symbiote primaire, mais sa relation exacte avec le symbiote reste à préciser. Est-il ancré à la membrane symbiosomale ? Interagit-il directement avec la paroi ou pénètre-t-il dans la bactérie ?

De telles interactions sont connues pour d'autres peptides riches en cystéines, comme NCR247, qui interagit directement avec FtsZ, les ribosomes, GroEL et d'autres protéines intracellulaires chez *S. meliloti* (Farkas *et al.*, 2014 ; Penterman *et al.*, 2014) ; ou (ii) la coléoptéricine A, qui cible plusieurs protéines de *Sodalis* chez le charançon (Login *et al.*, 2011).

Des observations fines en microscopie électronique couplée à un marquage immunogold pourraient répondre à ces questions de co-localisation / co-expression avec des partenaires connus. Des expériences en cours dans notre laboratoire (far-western blot, co-immunoprécipitation couplée à la spectrométrie de masse) visent à identifier les protéines partenaires de BCR4, qu'elles soient d'origine bactérienne ou hôte. Ces travaux pourraient également révéler des interactions avec des protéines impliquées dans des modifications post-traductionnelles (MPT), ce qui offrirait de nouvelles clés pour comprendre les mécanismes d'action des BCR.

Thèse accessible à l'adresse : https://theses.insa-lyon.fr/publication/2025ISAL0089/these.pdf © [H. Terrasson], [2025], INSA Lyon, tous droits réservés

En conclusion, ma thèse apporte de nouveaux éléments cruciaux pour la compréhension du rôle des BCR dans la symbiose chez le puceron. La recherche sur ce sujet ne fait que commencer et de nombreuses questions restent à résoudre, Les travaux à venir permettront de mieux éclairer les mécanismes impliqués dans les interactions hôte-symbiote, au-delà même du modèle étudié ici, le puceron du pois.

Thèse accessible à l'adresse : https://theses.insa-lyon.fr/publication/2025ISAL0089/these.pdf © [H. Terrasson], [2025], INSA Lyon, tous droits réservés

BIBLIOGRAPHIE

Abedi, Z., Razmjou, J., Rafiee Dastjerdi, H., & Ebadollahi, A. (2024). Physical and biochemical characteristics of cereal grains affect population growth parameters of *Sitophilus oryzae* (L.) (Coleoptera: Curculionidae). *Journal of Stored Products Research*, 109, 102459. https://doi.org/10.1016/j.jspr.2024.102459

Agadi, N., Maity, A., Jha, A. K., Chakrabarti, R., & Kumar, A. (2022). Distinct mode of membrane interaction and disintegration by diverse class of antimicrobial peptides. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes*, 1864(12), 184047. https://doi.org/10.1016/j.bbamem.2022.184047

Akman Gündüz, E., & Douglas, A. E. (2009). Symbiotic bacteria enable insect to use a nutritionally inadequate diet. *Proceedings. Biological Sciences*, 276(1658), 987–991. https://doi.org/10.1098/rspb.2008.1476

Akman, L., Yamashita, A., Watanabe, H., Oshima, K., Shiba, T., Hattori, M., & Aksoy, S. (2002). Genome sequence of the endocellular obligate symbiont of tsetse flies, *Wigglesworthia glossinidia*. *Nature Genetics*, 32(3), 402–407. https://doi.org/10.1038/ng986

Alarcón, M. E., Polo, P. G., Akyüz, S. N., & Rafiqi, A. M. (2022). Evolution and ontogeny of bacteriocytes in insects. *Frontiers in Physiology*, 13. https://doi.org/10.3389/fphys.2022.1034066

Ali Mohammadie Kojour, M., Han, Y. S., & Jo, Y. H. (2020). An overview of insect innate immunity. *Entomological Research*, 50(6), 282–291. https://doi.org/10.1111/1748-5967.12437

Anselme, C., Pérez-Brocal, V., Vallier, A., Vincent-Monegat, C., Charif, D., Latorre, A., … Heddi, A. (2008). Identification of the weevil immune genes and their expression in the bacteriome tissue. *BMC Biology*, 6(1), 43. https://doi.org/10.1186/1741-7007-6-43

Arias-Rojas, A., Frahm, D., Hurwitz, R., Brinkmann, V., & Iatsenko, I. (2023). Resistance to host antimicrobial peptides mediates resilience of gut commensals during infection and aging in *Drosophila*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 120(36), e2305649120. https://doi.org/10.1073/pnas.2305649120

Attardo, G. M., Lohs, C., Heddi, A., Alam, U. H., Yildirim, S., & Aksoy, S. (2008). Analysis of milk gland structure and function in *Glossina morsitans*: Milk protein production, symbiont populations and fecundity. *Journal of Insect Physiology*, 54(8), 1236–1242. https://doi.org/10.1016/j.jinsphys.2008.06.008

Baa-Puyoulet, P., Gerlin, L., Parisot, N., Peignier, S., Renoz, F., Calevro, F., & Charles, H. (2025). ArtSymbioCyc, a metabolic network database collection dedicated to arthropod symbioses: A case study, the tripartite cooperation in *Sipha maydis*. *mSystems*, 10(4), e00140-25. https://doi.org/10.1128/msystems.00140-25

Bai, S., Yao, Z., Raza, M. F., Cai, Z., & Zhang, H. (2021). Regulatory mechanisms of microbial homeostasis in insect gut. *Insect Science*, 28(2), 286–301. https://doi.org/10.1111/1744-7917.12868

Balmand, S., Lohs, C., Aksoy, S., & Heddi, A. (2013). Tissue distribution and transmission routes for the tsetse fly endosymbionts. *Journal of Invertebrate Pathology*, 112, S116–S122. https://doi.org/10.1016/j.jip.2012.04.002

Bang, I. S. (2019). JAK/STAT signaling in insect innate immunity. *Entomological Research*, 49(8), 339–353. https://doi.org/10.1111/1748-5967.12384

Bary, A. de. (1879). *Die Erscheinung der Symbiose: Vortrag gehalten auf der Versammlung Deutscher Naturforscher und Aerzte zu Cassel*. Trübner.

Baumann, P., Lai, C., Baumann, L., Rouhbakhsh, D., Moran, N. A., & Clark, M. A. (1995). Mutualistic associations of aphids and prokaryotes: Biology of the genus *Buchnera*. *Applied and Environmental Microbiology*, 61(1), 1–7. https://doi.org/10.1128/aem.61.1.1-7.1995

Baumann, Paul. (2005). Biology of bacteriocyte-associated endosymbionts of plant sap-sucking insects. *Annual Review of Microbiology*, 59, 155–189. https://doi.org/10.1146/annurev.micro.59.030804.121041

Benhamou, S., Rahioui, I., Henri, H., Charles, H., Da Silva, P., Heddi, A., … Mouton, L. (2021). Cytotype affects the capability of the whitefly *Bemisia tabaci* MED species to feed and oviposit on an unfavorable host plant. *mBio*, 12(6), e0073021. https://doi.org/10.1128/mBio.00730-21

Bennett, G. M., & Moran, N. A. (2013). Small, smaller, smallest: The origins and evolution of ancient dual symbioses in a phloem-feeding insect. *Genome Biology and Evolution*, 5(9), 1675. https://doi.org/10.1093/gbe/evt118

Bennett, G. M., & Moran, N. A. (2015). Heritable symbiosis: The advantages and perils of an evolutionary rabbit hole. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 112(33), 10169–10176. https://doi.org/10.1073/pnas.1421388112

Thèse accessible à l'adresse : https://theses.insa-lyon.fr/publication/2025ISAL0089/these.pdf © [H. Terrasson], [2025], INSA Lyon, tous droits réservés

Bennett, G. M., & Chong, R. A. (2017). Genome-wide transcriptional dynamics in the companion bacterial symbionts of the glassy-winged sharpshooter (*Cicadellidae*: *Homalodisca vitripennis*) reveal differential gene expression in bacteria occupying multiple host organs. *G3 (Bethesda, Md.)*, 7(9), 3073–3082. https://doi.org/10.1534/g3.117.044255

Bennett, G. M., Kwak, Y., & Maynard, R. (2024). Endosymbioses Have Shaped the Evolution of Biological Diversity and Complexity Time and Time Again. *Genome Biology and Evolution*, *16*(6), evae112. https://doi.org/10.1093/gbe/evae112

Bever, J. D., Richardson, S. C., Lawrence, B. M., Holmes, J., & Watson, M. (2009). Preferential allocation to beneficial symbiont with spatial structure maintains mycorrhizal mutualism. *Ecology Letters*, 12(1), 13–21. https://doi.org/10.1111/j.1461-0248.2008.01254.x

Bidla, G., Dushay, M. S., & Theopold, U. (2007). Crystal cell rupture after injury in *Drosophila* requires the JNK pathway, small GTPases and the TNF homolog Eiger. *Journal of Cell Science*, 120(Pt 7), 1209–1215. https://doi.org/10.1242/jcs.03420

Bing, X., Attardo, G. M., Vigneron, A., Aksoy, E., Scolari, F., Malacrida, A., … Aksoy, S. (2017). Unravelling the relationship between the tsetse fly and its obligate symbiont *Wigglesworthia*: Transcriptomic and metabolomic landscapes reveal highly integrated physiological networks. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, 284(1857), 20170360. https://doi.org/10.1098/rspb.2017.0360

Bodawatta, K. H., Freiberga, I., Puzejova, K., Sam, K., Poulsen, M., & Jønsson, K. A. (2021). Flexibility and resilience of great tit (*Parus major*) gut microbiomes to changing diets. *Animal Microbiome*, 3(1), 1–14. https://doi.org/10.1186/s42523-021-00076-6

Boivin, G. (2009). Reproduction and immature development of egg parasitoids. In *Egg parasitoids in agroecosystems with emphasis on Trichogramma* (pp. 1–23). Springer, Dordrecht. https://doi.org/10.1007/978-1-4020-9110-0_1

Brady, C. M., Asplen, M. K., Desneux, N., Heimpel, G. E., Hopper, K. R., Linnen, C. R., … White, J. A. (2014). Worldwide populations of the aphid *Aphis craccivora* are infected with diverse facultative bacterial symbionts. *Microbial Ecology*, 67(1), 195–204. https://doi.org/10.1007/s00248-013-0314-0

Braendle, C., Miura, T., Bickel, R., Shingleton, A. W., Kambhampati, S., & Stern, D. L. (2003). Developmental origin and evolution of bacteriocytes in the aphid–*Buchnera* symbiosis. *PLOS Biology*, 1(1), e21. https://doi.org/10.1371/journal.pbio.0000021

Brinza, L., Viñuelas, J., Cottret, L., Calevro, F., Rahbé, Y., Febvay, G., … Charles, H. (2009). Systemic analysis of the symbiotic function of *Buchnera aphidicola*, the primary endosymbiont of the pea aphid *Acyrthosiphon pisum*. *Comptes Rendus Biologies*, 332(11), 1034–1049. https://doi.org/10.1016/j.crvi.2009.09.007

Broderick, N. A., Buchon, N., & Lemaitre, B. (2014). Microbiota-induced changes in *Drosophila melanogaster* host gene expression and gut morphology. *mBio*, 5(3), e01117-14. https://doi.org/10.1128/mbio.01117-14

Brogden, K. A. (2005). Antimicrobial peptides: Pore formers or metabolic inhibitors in bacteria? *Nature Reviews Microbiology*, *3*(3), 238–250. https://doi.org/10.1038/nrmicro1098

Brune, A. (2014). Symbiotic digestion of lignocellulose in termite guts. *Nature Reviews Microbiology*, 12(3), 168–180. https://doi.org/10.1038/nrmicro3182

Brune, A., & Dietrich, C. (2015). The gut microbiota of termites: Digesting the diversity in the light of ecology and evolution. *Annual Review of Microbiology*, 69, 145–166. https://doi.org/10.1146/annurev-micro-092412-155715

Buchner, P. (1965). *Endosymbiosis of animals with plant microorganisms*. Wiley.

Buchon, N., Broderick, N. A., Poidevin, M., Pradervand, S., & Lemaitre, B. (2009). *Drosophila* intestinal response to bacterial infection: Activation of host defense and stem cell proliferation. *Cell Host & Microbe*, 5(2), 200–211. https://doi.org/10.1016/j.chom.2009.01.003

Buchon, N., Broderick, N. A., & Lemaitre, B. (2013a). Gut homeostasis in a microbial world: Insights from *Drosophila melanogaster*. *Nature Reviews Microbiology*, 11(9), 615–626. https://doi.org/10.1038/nrmicro3074

Buchon, N., Osman, D., David, F. P. A., Yu Fang, H., Boquete, J.-P., Deplancke, B., & Lemaitre, B. (2013b). Morphological and molecular characterization of adult midgut compartmentalization in *Drosophila*. *Cell Reports*, 3(5), 1725–1738. https://doi.org/10.1016/j.celrep.2013.04.001

Burke, G. R., Normark, B. B., Favret, C., & Moran, N. A. (2009). Evolution and diversity of facultative symbionts from the aphid subfamily Lachninae. *Applied and Environmental Microbiology*, 75(16), 5328–5335. https://doi.org/10.1128/AEM.00717-09

Burke, G. R., & Moran, N. A. (2011). Responses of the pea aphid transcriptome to infection by facultative symbionts. *Insect Molecular Biology*, 20(3), 357–365. https://doi.org/10.1111/j.1365-2583.2011.01070.x

Calevro, F., Tagu, D., & Callaerts, P. (2019). *Acyrthosiphon pisum*. *Trends in Genetics*, 35(10), 781–782. https://doi.org/10.1016/j.tig.2019.07.003

Thèse accessible à l'adresse : https://theses.insa-lyon.fr/publication/2025ISAL0089/these.pdf © [H. Terrasson], [2025], INSA Lyon, tous droits réservés

Callegari, M., Crotti, E., Fusi, M., Marasco, R., Gonella, E., De Noni, I., … Daffonchio, D. (2021). Compartmentalization of bacterial and fungal microbiomes in the gut of adult honeybees. *npj Biofilms and Microbiomes*, 7(1), 42. https://doi.org/10.1038/s41522-021-00212-9

Carro, L., Pujic, P., Alloisio, N., Fournier, P., Boubakri, H., Hay, A. E., … Normand, P. (2015). *Alnus* peptides modify membrane porosity and induce the release of nitrogen-rich metabolites from nitrogen-fixing *Frankia*. *The ISME Journal*, 9(8), 1723–1733. https://doi.org/10.1038/ismej.2014.257

Cayetano, L., Rothacher, L., Simon, J.-C., & Vorburger, C. (2015). Cheaper is not always worse: Strongly protective isolates of a defensive symbiont are less costly to the aphid host. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, 282(1799), 20142333. https://doi.org/10.1098/rspb.2014.2333

Charles, H., Balmand, S., Lamelas, A., Cottret, L., Pérez-Brocal, V., Burdin, B., … Rahbé, Y. (2011). A genomic reappraisal of symbiotic function in the aphid/*Buchnera* symbiosis: Reduced transporter sets and variable membrane organisations. *PLOS ONE*, 6(12), e29096. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0029096

Charroux, B., Capo, F., Kurz, C. L., Peslier, S., Chaduli, D., Viallat-Lieutaud, A., & Royet, J. (2018). Cytosolic and secreted peptidoglycan-degrading enzymes in *Drosophila* respectively control local and systemic immune responses to microbiota. *Cell Host & Microbe*, 23(2), 215–228.e4. https://doi.org/10.1016/j.chom.2017.12.007

Chen, D.-Q., Montllor, C. B., & Purcell, A. H. (2000). Fitness effects of two facultative endosymbiotic bacteria on the pea aphid, *Acyrthosiphon pisum*, and the blue alfalfa aphid, *A. kondoi*. *Entomologia Experimentalis et Applicata*, 95(3), 315–323. https://doi.org/10.1046/j.1570-7458.2000.00670.x

Cherqui, A., Alla, S., Saguez, J., Doury, G., Sangwan-Norreel, B. S., & Giordanengo, P. (2003). Probiotic effects of beta-glucuronidase on the peach-potato aphid *Myzus persicae* (*Aphididae*). *Journal of Insect Physiology*, 49(12), 1199–1209. https://doi.org/10.1016/j.jinsphys.2003.09.004

Chomicki, G., Werner, G. D. A., West, S. A., & Kiers, E. T. (2020). Compartmentalization drives the evolution of symbiotic cooperation. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, 375(1808), 20190602. https://doi.org/10.1098/rstb.2019.0602

Chong, R. A., & Moran, N. A. (2016). Intraspecific genetic variation in hosts affects regulation of obligate heritable symbionts. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 113(46), 13114–13119. https://doi.org/10.1073/pnas.1610749113

Chong, R. A., & Moran, N. A. (2018). Evolutionary loss and replacement of *Buchnera*, the obligate endosymbiont of aphids. *The ISME Journal*, 12(3), 898–908. https://doi.org/10.1038/s41396-017-0024-6

Christiaens, O., Swevers, L., & Smagghe, G. (2014). dsRNA degradation in the pea aphid (*Acyrthosiphon pisum*) associated with lack of response in RNAi feeding and injection assay. *Peptides*, 53, 307–314. https://doi.org/10.1016/j.peptides.2013.12.014

Corbin, C., Heyworth, E. R., Ferrari, J., & Hurst, G. D. D. (2017). Heritable symbionts in a world of varying temperature. *Heredity*, 118(1), 10–20. https://doi.org/10.1038/hdy.2016.71

Currie, C. R., Poulsen, M., Mendenhall, J., Boomsma, J. J., & Billen, J. (2006). Coevolved crypts and exocrine glands support mutualistic bacteria in fungus-growing ants. *Science*, 311(5757), 81–83. https://doi.org/10.1126/science.1119744

Dearing, M. D., Kaltenpoth, M., & Gershenzon, J. (2022). Demonstrating the role of symbionts in mediating detoxification in herbivores. *Symbiosis*, 87(1), 59–66. https://doi.org/10.1007/s13199-022-00863-y

Dedryver, C.-A., Le Ralec, A., & Fabre, F. (2010). The conflicting relationships between aphids and men: A review of aphid damage and control strategies. *Comptes Rendus Biologies*, 333(6), 539–553. https://doi.org/10.1016/j.crvi.2010.03.009

Delaney, J. R., Stöven, S., Uvell, H., Anderson, K. V., Engström, Y., & Mlodzik, M. (2006). Cooperative control of *Drosophila* immune responses by the JNK and NF-κB signaling pathways. *The EMBO Journal*, 25(13), 3068–3077. https://doi.org/10.1038/sj.emboj.7601182

Dell'Aglio, E., Lacotte, V., Peignier, S., Rahioui, I., Benzaoui, F., Vallier, A., … Rebollo, R. (2023). Weevil carbohydrate intake triggers endosymbiont proliferation: A trade-off between host benefit and endosymbiont burden. *mBio*, 14(2), e03333-22. https://doi.org/10.1128/mbio.03333-22

Demina, I. V., Persson, T., Santos, P., Plaszczyca, M., & Pawlowski, K. (2013). Comparison of the nodule vs. root transcriptome of the actinorhizal plant *Datisca glomerata*: Actinorhizal nodules contain a specific class of defensins. *PLOS ONE*, 8(8), e72442. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0072442

Deng, J., Bennett, G. M., Franco, D. C., Prus-Frankowska, M., Stroiński, A., Michalik, A., & Łukasik, P. (2023). Genome comparison reveals inversions and alternative evolutionary history of nutritional endosymbionts in planthoppers (*Hemiptera*: *Fulgoromorpha*). *Genome Biology and Evolution*, 15(7), evad120. https://doi.org/10.1093/gbe/evad120

Thèse accessible à l'adresse : https://theses.insa-lyon.fr/publication/2025ISAL0089/these.pdf © [H. Terrasson], [2025], INSA Lyon, tous droits réservés

Ding, B., Zhang, C., He, L., Zeng, Q., Zhang, S., Yang, H., & Yang, H. (2024). JAK/STAT signaling pathway is involved in antibacterial immunity in the green peach aphid *Myzus persicae* (Sulzer). *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 205, 106168. https://doi.org/10.1016/j.pestbp.2024.106168

Dittmer, J., Corretto, E., Štarhová Serbina, L., Michalik, A., Nováková, E., & Schuler, H. (2023). Division of labor within psyllids: Metagenomics reveals an ancient dual endosymbiosis with metabolic complementarity in the genus *Cacopsylla*. *mSystems*, 8(5), e00578-23. https://doi.org/10.1128/msystems.00578-23

Douglas, A. E. (1989). Mycetocyte symbiosis in insects. *Biological Reviews of the Cambridge Philosophical Society*, 64(4), 409–434. https://doi.org/10.1111/j.1469-185x.1989.tb00682.x

Douglas, A. E. (1992). Requirement of pea aphids (*Acyrthosiphon pisum*) for their symbiotic bacteria. *Entomologia Experimentalis et Applicata*, 65(2), 195–198. https://doi.org/10.1111/j.1570-7458.1992.tb01643.x

Douglas, A. E. (1993). The nutritional quality of phloem sap utilized by natural aphid populations. *Ecological Entomology*, 18(1), 31–38. https://doi.org/10.1111/j.1365-2311.1993.tb01076.x

Douglas, A. E. (1996). Reproductive failure and the free amino acid pools in pea aphids (*Acyrthosiphon pisum*) lacking symbiotic bacteria. *Journal of Insect Physiology*, 42(3), 247–255. https://doi.org/10.1016/0022-1910(95)00105-0

Douglas, A. E. (1998). Nutritional interactions in insect-microbial symbioses: Aphids and their symbiotic bacteria *Buchnera*. *Annual Review of Entomology*, 43, 17–37. https://doi.org/10.1146/annurev.ento.43.1.17

Douglas, A. E. (2003). The nutritional physiology of aphids. In *Advances in Insect Physiology* (Vol. 31, pp. 73–140). Academic Press. https://doi.org/10.1016/S0065-2806(03)31002-1

Douglas, A. E., & Emden, H. F. van. (2007). Nutrition and symbiosis. In *CABI Books*. *Aphids as crop pests* (pp. 115–134). https://doi.org/10.1079/9780851998190.0115

Douglas, A. E. (2009). The microbial dimension in insect nutritional ecology. *Functional Ecology*, 23(1), 38–47. https://doi.org/10.1111/j.1365-2435.2008.01442.x

Douglas, A. E., Bouvaine, S., & Russell, R. R. (2010). How the insect immune system interacts with an obligate symbiotic bacterium. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, 278(1704), 333–338. https://doi.org/10.1098/rspb.2010.1563

Douglas, A. E. (2011). Lessons from studying insect symbioses. *Cell Host & Microbe*, 10(4), 359–367. https://doi.org/10.1016/j.chom.2011.09.001

Douglas, A. E. (2016). How multi-partner endosymbioses function. *Nature Reviews Microbiology*, 14(12), 731–743. https://doi.org/10.1038/nrmicro.2016.151

Drew, G. C., Stevens, E. J., & King, K. C. (2021). Microbial evolution and transitions along the parasite–mutualist *continuum*. *Nature Reviews Microbiology*, *19*(10), 623–638. https://doi.org/10.1038/s41579-021-00550-7

Drew, G. C., & King, K. C. (2022). More or less? The effect of symbiont density in protective mutualisms. *The American Naturalist*, 199(4), 443–454. https://doi.org/10.1086/718593

Duron, O., Morel, O., Noël, V., Buysse, M., Binetruy, F., Lancelot, R., … Vial, L. (2018). Tick-bacteria mutualism depends on B vitamin synthesis pathways. *Current Biology*, 28(12), 1896–1902.e5. https://doi.org/10.1016/j.cub.2018.04.038

Duron, O., & Gottlieb, Y. (2020). Convergence of nutritional symbioses in obligate blood feeders. *Trends in Parasitology*, 36(10), 816–825. https://doi.org/10.1016/j.pt.2020.07.007

Duron, O. (2024). Nutritional symbiosis in ticks: Singularities of the genus *Ixodes*. *Trends in Parasitology*, 40(8), 696–706. https://doi.org/10.1016/j.pt.2024.06.006

Ebbensgaard, A., Mordhorst, H., Aarestrup, F. M., & Hansen, E. B. (2018). The role of outer membrane proteins and lipopolysaccharides for the sensitivity of *Escherichia coli* to antimicrobial peptides. *Frontiers in Microbiology*, 9, 2153. https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.02153

Engel, P., & Moran, N. A. (2013). The gut microbiota of insects – diversity in structure and function. *FEMS Microbiology Reviews*, 37(5), 699–735. https://doi.org/10.1111/1574-6976.12025

Everett, K. D. E., Thao, M., Horn, M., Dyszynski, G. E., & Baumann, P. (2005). Novel chlamydiae in whiteflies and scale insects: Endosymbionts 'Candidatus Fritschea bemisiae' strain Falk and 'Candidatus Fritschea eriococci' strain Elm. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 55(4), 1581–1587. https://doi.org/10.1099/ijs.0.63454-0

Farkas, A., Maróti, G., Dürgő, H., Györgypál, Z., Lima, R. M., Medzihradszky, K. F., … Kondorosi, É. (2014). *Medicago truncatula* symbiotic peptide NCR247 contributes to bacteroid differentiation through multiple mechanisms. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 111(14), 5183–5188. https://doi.org/10.1073/pnas.1404169111

Thèse accessible à l'adresse : https://theses.insa-lyon.fr/publication/2025ISAL0089/these.pdf © [H. Terrasson], [2025], INSA Lyon, tous droits réservés

Feldhaar, H., Straka, J., Krischke, M., Berthold, K., Stoll, S., Mueller, M. J., & Gross, R. (2007). Nutritional upgrading for omnivorous carpenter ants by the endosymbiont *Blochmannia*. *BMC Biology*, 5(1), 48. https://doi.org/10.1186/1741-7007-5-48

Ferrarini, M. G., Dell'Aglio, E., Vallier, A., Balmand, S., Vincent-Monégat, C., Hughes, S., … Rebollo, R. (2022). Efficient compartmentalization in insect bacteriomes protects symbiotic bacteria from host immune system. *Microbiome*, 10(1), 156. https://doi.org/10.1186/s40168-022-01334-8

Ferrarini, M. G., Vallier, A., Dell'Aglio, E., Balmand, S., Vincent-Monégat, C., Debbache, M., … Rebollo, R. (2023). Endosymbiont-containing germarium transcriptional survey in a cereal weevil depicts downregulation of immune effectors at the onset of sexual maturity. *Frontiers in Physiology*, 14, 1142513. https://doi.org/10.3389/fphys.2023.1142513

Fourriere, L., Jimenez, A. J., Perez, F., & Boncompain, G. (2020). The role of microtubules in secretory protein transport. *Journal of Cell Science*, 133(2), jcs237016. https://doi.org/10.1242/jcs.237016

Fujiwara, A., Meng, X.-Y., Kamagata, Y., & Tsuchida, T. (2022). Subcellular niche segregation of co-obligate symbionts in whiteflies. *Microbiology Spectrum*, 11(1), e04684-22. https://doi.org/10.1128/spectrum.04684-22

Fukatsu, T. (2001). Secondary intracellular symbiotic bacteria in aphids of the genus *Yamatocallis* (*Homoptera*: *Aphididae*: *Drepanosiphinae*). *Applied and Environmental Microbiology*, 67(11), 5315–5320. https://doi.org/10.1128/AEM.67.11.5315-5320.2001

Futahashi, R., Tanaka, K., Tanahashi, M., Nikoh, N., Kikuchi, Y., Lee, B. L., & Fukatsu, T. (2013). Gene expression in gut symbiotic organ of stinkbug affected by extracellular bacterial symbiont. *PLOS ONE*, 8(5), e64557. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0064557

Galambos, N., Vincent-Monegat, C., Vallier, A., Parisot, N., Heddi, A., & Zaidman-Rémy, A. (2024). Cereal weevils' antimicrobial peptides: At the crosstalk between development, endosymbiosis and immune response. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, 379(1901), 20230062. https://doi.org/10.1098/rstb.2023.0062

Gerardo, N. M., Altincicek, B., Anselme, C., Atamian, H., Barribeau, S. M., de Vos, M., … Vilcinskas, A. (2010). Immunity and other defenses in pea aphids, *Acyrthosiphon pisum*. *Genome Biology*, 11(2), R21. https://doi.org/10.1186/gb-2010-11-2-r21

Goldstein, E. B., de Anda Acosta, Y., Henry, L. M., & Parker, B. J. (2023). Variation in density, immune gene suppression, and coinfection outcomes among strains of the aphid endosymbiont *Regiella insecticola*. *Evolution*, 77(7), 1704–1711. https://doi.org/10.1093/evolut/qpad071

Gonella, E., Negri, I., Marzorati, M., Mandrioli, M., Sacchi, L., Pajoro, M., … Daffonchio, D. (2011). Bacterial endosymbiont localization in *Hyalesthes obsoletus*, the insect vector of Bois noir in *Vitis vinifera*. *Applied and Environmental Microbiology*, 77(4), 1423–1435. https://doi.org/10.1128/AEM.02121-10

González-Castro, R., Gómez-Lim, M. A., & Plisson, F. (2021). Cysteine-rich peptides: Hyperstable scaffolds for protein engineering. *ChemBioChem*, 22(6), 961–973. https://doi.org/10.1002/cbic.202000634

Goodhead, I., Blow, F., Brownridge, P., Hughes, M., Kenny, J., Krishna, R., … Darby, A. C. (2020). Large-scale and significant expression from pseudogenes in *Sodalis glossinidius* – a facultative bacterial endosymbiont. *Microbial Genomics*, 6(1), e000285. https://doi.org/10.1099/mgen.0.000285

Griffiths, G. W., & Beck, S. D. (1975). Ultrastructure of pea aphid mycetocytes: Evidence for symbiote secretion. *Cell and Tissue Research*, 159(3), 351–367. https://doi.org/10.1007/BF00221782

Guefrachi, I., Nagymihaly, M., Pislariu, C. I., Van de Velde, W., Ratet, P., Mars, M., … Alunni, B. (2014). Extreme specificity of NCR gene expression in *Medicago truncatula*. *BMC Genomics*, 15(1), 712. https://doi.org/10.1186/1471-2164-15-712

Gueguen, G., Vavre, F., Gnankine, O., Peterschmitt, M., Charif, D., Chiel, E., … Fleury, F. (2010). Endosymbiont metacommunities, mtDNA diversity and the evolution of the *Bemisia tabaci* (*Hemiptera*: *Aleyrodidae*) species complex. *Molecular Ecology*, 19(19), 4365–4376. https://doi.org/10.1111/j.1365-294X.2010.04775.x

Guo, J., Hatt, S., He, K., Chen, J., Francis, F., & Wang, Z. (2017). Nine facultative endosymbionts in aphids: A review. *Journal of Asia-Pacific Entomology*, 20(3), 794–801. https://doi.org/10.1016/j.aspen.2017.03.025

Guo, L., Karpac, J., Tran, S. L., & Jasper, H. (2014). PGRP-SC2 promotes gut immune homeostasis to limit commensal dysbiosis and extend lifespan. *Cell*, 156(1), 109–122. https://doi.org/10.1016/j.cell.2013.12.018

Guo, L., Tang, J., Tang, M., Luo, S., & Zhou, X. (2023). Reactive oxygen species are regulated by immune deficiency and Toll pathways in determining the host specificity of honeybee gut bacteria. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 120(33), e2219634120. https://doi.org/10.1073/pnas.2219634120

Gupta, A., & Nair, S. (2020). Dynamics of insect–microbiome interaction influence host and microbial symbiont. *Frontiers in Microbiology*, 11, 1357. https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.01357

Thèse accessible à l'adresse : https://theses.insa-lyon.fr/publication/2025ISAL0089/these.pdf © [H. Terrasson], [2025], INSA Lyon, tous droits réservés

Haag, A. F., Baloban, M., Sani, M., Kerscher, B., Pierre, O., Farkas, A., … Ferguson, G. P. (2011). Protection of *Sinorhizobium* against host cysteine-rich antimicrobial peptides is critical for symbiosis. *PLOS Biology*, 9(10), e1001169. https://doi.org/10.1371/journal.pbio.1001169

Hammer, T. J., & Moran, N. A. (2019). Links between metamorphosis and symbiosis in holometabolous insects. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, 374(1783), 20190068. https://doi.org/10.1098/rstb.2019.0068

Hansen, A. K., & Moran, N. A. (2011). Aphid genome expression reveals host–symbiont cooperation in the production of amino acids. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 108(7), 2849–2854. https://doi.org/10.1073/pnas.1013465108

Hansen, A. K., & Moran, N. A. (2014). The impact of microbial symbionts on host plant utilization by herbivorous insects. *Molecular Ecology*, 23(6), 1473–1496. https://doi.org/10.1111/mec.12421

Hanson, M. A., Dostálová, A., Ceroni, C., Poidevin, M., Kondo, S., & Lemaitre, B. (2019). Synergy and remarkable specificity of antimicrobial peptides in vivo using a systematic knockout approach. *eLife*, 8, e44341. https://doi.org/10.7554/eLife.44341

Heddi, A., Lefebvre, F., & Nardon, P. (1993). Effect of endocytobiotic bacteria on mitochondrial enzymatic activities in the weevil *Sitophilus oryzae* (*Coleoptera*: *Curculionidae*). *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 23(3), 403–411. https://doi.org/10.1016/0965-1748(93)90024-M

Heddi, A., Grenier, A. M., Khatchadourian, C., Charles, H., & Nardon, P. (1999). Four intracellular genomes direct weevil biology: Nuclear, mitochondrial, principal endosymbiont, and *Wolbachia*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 96(12), 6814–6819. https://doi.org/10.1073/pnas.96.12.6814

Hickin, M. L., Kakumanu, M. L., & Schal, C. (2022). Effects of *Wolbachia* elimination and B-vitamin supplementation on bed bug development and reproduction. *Scientific Reports*, 12(1), 10270. https://doi.org/10.1038/s41598-022-14505-2

Higashi, C. H. V., Nichols, W. L., Chevignon, G., Patel, V., Allison, S. E., Kim, K. L., … Oliver, K. M. (2023). An aphid symbiont confers protection against a specialized RNA virus, another increases vulnerability to the same pathogen. *Molecular Ecology*, 32(4), 936–950. https://doi.org/10.1111/mec.16801

Hocher, V., Alloisio, N., Auguy, F., Fournier, P., Doumas, P., Pujic, P., … Bogusz, D. (2011). Transcriptomics of actinorhizal symbioses reveals homologs of the whole common symbiotic signaling cascade. *Plant Physiology*, 156(2), 700–711. https://doi.org/10.1104/pp.111.174151

Hogenhout, S. A., Ammar, E.-D., Whitfield, A. E., & Redinbaugh, M. G. (2008). Insect vector interactions with persistently transmitted viruses. *Annual Review of Phytopathology*, 46, 327–359. https://doi.org/10.1146/annurev.phyto.022508.092135

Hongoh, Y., Sharma, V. K., Prakash, T., Noda, S., Toh, H., Taylor, T. D., … Ohkuma, M. (2008). Genome of an endosymbiont coupling N2 fixation to cellulolysis within protist cells in termite gut. *Science*, 322(5904), 1108–1109. https://doi.org/10.1126/science.1165578

Horváth, B., Domonkos, Á., Kereszt, A., Szűcs, A., Ábrahám, E., Ayaydin, F., … Kaló, P. (2015). Loss of the nodule-specific cysteine-rich peptide, NCR169, abolishes symbiotic nitrogen fixation in the *Medicago truncatula* dnf7 mutant. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 112(49), 15232–15237. https://doi.org/10.1073/pnas.1500777112

Hosokawa, T., Kikuchi, Y., Nikoh, N., Shimada, M., & Fukatsu, T. (2006). Strict host-symbiont cospeciation and reductive genome evolution in insect gut bacteria. *PLOS Biology*, 4(10), e337. https://doi.org/10.1371/journal.pbio.0040337

Hosokawa, T., Koga, R., Kikuchi, Y., Meng, X.-Y., & Fukatsu, T. (2010). *Wolbachia* as a bacteriocyte-associated nutritional mutualist. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 107(2), 769–774. https://doi.org/10.1073/pnas.0911476107

Hosokawa, T., Imanishi, M., Koga, R., & Fukatsu, T. (2019). Diversity and evolution of bacterial symbionts in the gut symbiotic organ of jewel stinkbugs (*Hemiptera*: *Scutelleridae*). *Applied Entomology and Zoology*, 54(4), 359–367. https://doi.org/10.1007/s13355-019-00630-4

Houk, E. J., & Griffiths, G. W. (1980). Intracellular symbiotes of the *Homoptera*. *Annual Review of Entomology*, 25, 161–187. https://doi.org/10.1146/annurev.en.25.010180.001113

Husnik, F., Nikoh, N., Koga, R., Ross, L., Duncan, R. P., Fujie, M., … McCutcheon, J. P. (2013). Horizontal gene transfer from diverse bacteria to an insect genome enables a tripartite nested mealybug symbiosis. *Cell*, 153(7), 1567–1578. https://doi.org/10.1016/j.cell.2013.05.040

Husnik, F., & McCutcheon, J. P. (2016). Repeated replacement of an intrabacterial symbiont in the tripartite nested mealybug symbiosis. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 113(37), E5416–E5424. https://doi.org/10.1073/pnas.1603910113

Igaki, T., Kanda, H., Yamamoto-Goto, Y., Kanuka, H., Kuranaga, E., Aigaki, T., & Miura, M. (2002). Eiger, a TNF superfamily ligand that triggers the *Drosophila* JNK pathway. *The EMBO Journal*, 21(12), 3009–3018. https://doi.org/10.1093/emboj/cdf306

Thèse accessible à l'adresse : https://theses.insa-lyon.fr/publication/2025ISAL0089/these.pdf © [H. Terrasson], [2025], INSA Lyon, tous droits réservés

Inagaki, T., & Matsuura, K. (2018). Extended mutualism between termites and gut microbes: Nutritional symbionts contribute to nest hygiene. *The Science of Nature*, 105(9), 1–10. https://doi.org/10.1007/s00114-018-1580-y

International Aphid Genomics Consortium. (2010). Genome sequence of the pea aphid *Acyrthosiphon pisum*. *PLOS Biology*, 8(2), e1000313. https://doi.org/10.1371/journal.pbio.1000313

Itoh, H., Tago, K., Hayatsu, M., & Kikuchi, Y. (2018). Detoxifying symbiosis: Microbe-mediated detoxification of phytotoxins and pesticides in insects. *Natural Product Reports*, 35(5), 434–454. https://doi.org/10.1039/C7NP00051K

Itoh, H., Jang, S., Takeshita, K., Ohbayashi, T., Ohnishi, N., Meng, X.-Y., … Kikuchi, Y. (2019). Host–symbiont specificity determined by microbe–microbe competition in an insect gut. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 116(45), 22673–22682. https://doi.org/10.1073/pnas.1912397116

Jones, K. M., Kobayashi, H., Davies, B. W., Taga, M. E., & Walker, G. C. (2007). How rhizobial symbionts invade plants: The *Sinorhizobium–Medicago* model. *Nature Reviews Microbiology*, 5(8), 619–633. https://doi.org/10.1038/nrmicro1705

Jousselin, E., Coeur d'acier, A., Clamens, A.-L., Galan, M., Cruaud, C., Barbe, V., & Manzano-Marín, A. (2024). Discordance between mitochondrial, nuclear, and symbiont genomes in aphid phylogenetics: Who is telling the truth? *Zoological Journal of the Linnean Society*, 201(4), zlae098. https://doi.org/10.1093/zoolinnean/zlae098

Kaech, H., Dennis, A. B., & Vorburger, C. (2021). Triple RNA-Seq characterizes aphid gene expression in response to infection with unequally virulent strains of the endosymbiont *Hamiltonella defensa*. *BMC Genomics*, 22(1), 449. https://doi.org/10.1186/s12864-021-07742-8

Kallio, J., Leinonen, A., Ulvila, J., Valanne, S., Ezekowitz, R. A., & Rämet, M. (2005). Functional analysis of immune response genes in *Drosophila* identifies JNK pathway as a regulator of antimicrobial peptide gene expression in S2 cells. *Microbes and Infection*, 7(5), 811–819. https://doi.org/10.1016/j.micinf.2005.03.014

Kaltenpoth, M., Flórez, L. V., Vigneron, A., Dirksen, P., & Engl, T. (2025). Origin and function of beneficial bacterial symbioses in insects. *Nature Reviews Microbiology*, 1–17. https://doi.org/10.1038/s41579-025-01164-z

Kanakala, S., & Ghanim, M. (2019). Global genetic diversity and geographical distribution of *Bemisia tabaci* and its bacterial endosymbionts. *PLOS ONE*, 14(3), e0213946. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0213946

Kho, J.-W., Jung, M., & Lee, D.-H. (2024). Effects of the symbiotic bacteria, *Caballeronia insecticola*, on the life history parameters of *Riptortus pedestris* (*Hemiptera*: *Alydidae*) and their implications for the host population growth. *Journal of Insect Science*, 24(5), 5. https://doi.org/10.1093/jisesa/ieae100

Khoshnood, B., Dacklin, I., & Grabbe, C. (2015). Urm1: An essential regulator of JNK signaling and oxidative stress in *Drosophila melanogaster*. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 73(9), 1939–1954. https://doi.org/10.1007/s00018-015-2121-x

Kikuchi, Y., Hosokawa, T., & Fukatsu, T. (2007). Insect-microbe mutualism without vertical transmission: A stinkbug acquires a beneficial gut symbiont from the environment every generation. *Applied and Environmental Microbiology*, 73(13), 4308–4316. https://doi.org/10.1128/AEM.00067-07

Kikuchi, Y., & Yumoto, I. (2013). Efficient colonization of the bean bug *Riptortus pedestris* by an environmentally transmitted *Burkholderia* symbiont. *Applied and Environmental Microbiology*, 79(6), 2088–2091. https://doi.org/10.1128/AEM.03299-12

Kim, J. K., Son, D. W., Kim, C.-H., Cho, J. H., Marchetti, R., Silipo, A., … Lee, B. L. (2015). Insect gut symbiont susceptibility to host antimicrobial peptides caused by alteration of the bacterial cell envelope. *Journal of Biological Chemistry*, 290(34), 21042–21053. https://doi.org/10.1074/jbc.M115.651158

Kim, J. K., Park, H. Y., & Lee, B. L. (2016). The symbiotic role of O-antigen of *Burkholderia* symbiont in association with host *Riptortus pedestris*. *Developmental & Comparative Immunology*, 60, 202–208. https://doi.org/10.1016/j.dci.2016.02.009

Kim, M., Chen, Y., Xi, J., Waters, C., Chen, R., & Wang, D. (2015). An antimicrobial peptide essential for bacterial survival in the nitrogen-fixing symbiosis. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 112(49), 15238–15243. https://doi.org/10.1073/pnas.1500123112

Kinjo, Y., Bourguignon, T., Hongoh, Y., Lo, N., Tokuda, G., & Ohkuma, M. (2022). Coevolution of metabolic pathways in *Blattodea* and their *Blattabacterium* endosymbionts, and comparisons with other insect-bacteria symbioses. *Microbiology Spectrum*, 10(5), e02779-22. https://doi.org/10.1128/spectrum.02779-22

Kirkness, E. F., Haas, B. J., Sun, W., Braig, H. R., Perotti, M. A., Clark, J. M., … Pittendrigh, B. R. (2010). Genome sequences of the human body louse and its primary endosymbiont provide insights into the permanent parasitic lifestyle. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 107(27), 12168–12173. https://doi.org/10.1073/pnas.1003379107

Kobiałka, M., Michalik, A., Szwedo, J., & Szklarzewicz, T. (2018). Diversity of symbiotic microbiota in *Deltocephalinae* leafhoppers (*Insecta*, *Hemiptera*, *Cicadellidae*). *Arthropod Structure & Development*, 47(3), 268–278. https://doi.org/10.1016/j.asd.2018.03.005

Thèse accessible à l'adresse : https://theses.insa-lyon.fr/publication/2025ISAL0089/these.pdf © [H. Terrasson], [2025], INSA Lyon, tous droits réservés

Koehbach, J. (2017). Structure-activity relationships of insect defensins. *Frontiers in Chemistry*, 5, 45. https://doi.org/10.3389/fchem.2017.00045

Koga, R., Tsuchida, T., & Fukatsu, T. (2003). Changing partners in an obligate symbiosis: A facultative endosymbiont can compensate for loss of the essential endosymbiont *Buchnera* in an aphid. *Proceedings of the Royal Society of London. Series B: Biological Sciences*, 270(1533), 2543–2550. https://doi.org/10.1098/rspb.2003.2537

Koga, R., Meng, X.-Y., Tsuchida, T., & Fukatsu, T. (2012). Cellular mechanism for selective vertical transmission of an obligate insect symbiont at the bacteriocyte–embryo interface. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 109(20), E1230–E1237. https://doi.org/10.1073/pnas.1119212109

Koga, R., Bennett, G. M., Cryan, J. R., & Moran, N. A. (2013). Evolutionary replacement of obligate symbionts in an ancient and diverse insect lineage. *Environmental Microbiology*, 15(7), 2073–2081. https://doi.org/10.1111/1462-2920.12121

Koga, R., & Moran, N. A. (2014). Swapping symbionts in spittlebugs: Evolutionary replacement of a reduced genome symbiont. *The ISME Journal*, 8(6), 1237–1246. https://doi.org/10.1038/ismej.2013.235

Komaki, K., & Ishikawa, H. (2000). Genomic copy number of intracellular bacterial symbionts of aphids varies in response to developmental stage and morph of their host. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 30(3), 253–258. https://doi.org/10.1016/S0965-1748(99)00125-3

Kondorosi, E., Mergaert, P., & Kereszt, A. (2013). A paradigm for endosymbiotic life: Cell differentiation of *Rhizobium* bacteria provoked by host plant factors. *Annual Review of Microbiology*, 67, 611–628. https://doi.org/10.1146/annurev-micro-092412-155630

Kontsedalov, S., Zchori-Fein, E., Chiel, E., Gottlieb, Y., Inbar, M., & Ghanim, M. (2008). The presence of *Rickettsia* is associated with increased susceptibility of *Bemisia tabaci* (*Homoptera*: *Aleyrodidae*) to insecticides. *Pest Management Science*, 64(8), 789–792. https://doi.org/10.1002/ps.1595

Koo, J., & Palli, S. R. (2024). Recent advances in understanding of the mechanisms of RNA interference in insects. *Insect Molecular Biology*.

Kuechler, S. M., Dettner, K., & Kehl, S. (2011). Characterization of an obligate intracellular bacterium in the midgut epithelium of the bulrush bug *Chilacis typhae* (Heteroptera, Lygaeidae, Artheneinae). *Applied and Environmental Microbiology*, 77(9), 2869–2876. https://doi.org/10.1128/AEM.02983-10

Kuechler, S. M., Gibbs, G., Burckhardt, D., Dettner, K., & Hartung, V. (2013). Diversity of bacterial endosymbionts and bacteria-host co-evolution in Gondwanan relict moss bugs (Hemiptera: Coleorrhyncha: Peloridiidae). *Environmental Microbiology*, 15(7), 2031–2042. https://doi.org/10.1111/1462-2920.12101

Kwak, Y., & Hansen, A. K. (2023). Unveiling metabolic integration in psyllids and their nutritional endosymbionts through comparative transcriptomics analysis. *iScience*, 26(10). https://doi.org/10.1016/j.isci.2023.107930

Kwak, Y., Argandona, J. A., Miao, S., Son, T. J., & Hansen, A. K. (2025). A dual insect symbiont and plant pathogen improves insect host fitness under arginine limitation. *mBio*, 0(0), e03588-24. https://doi.org/10.1128/mbio.03588-24

Kwong, W. K., Mancenido, A. L., & Moran, N. A. (2017). Immune system stimulation by the native gut microbiota of honey bees. *Royal Society Open Science*, 4(2), 170003. https://doi.org/10.1098/rsos.170003

Lachat, J. (2019). Identification in the bacterial symbiont *Burkholderia insecticola* of factors involved in antimicrobial peptide-resistance and colonization of the insect *Riptortus pedestris* (PhD thesis, Université Paris Saclay (COmUE)). Université Paris Saclay (COmUE). Retrieved from https://theses.hal.science/tel-02947367

Lachat, J., Lextrait, G., Jouan, R., Boukherissa, A., Yokota, A., Jang, S., … Mergaert, P. (2024). Hundreds of antimicrobial peptides create a selective barrier for insect gut symbionts. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 121(25), e2401802121. https://doi.org/10.1073/pnas.2401802121

Lamelas, A., Gosalbes, M. J., Manzano-Marín, A., Peretó, J., Moya, A., & Latorre, A. (2011). *Serratia symbiotica* from the aphid *Cinara cedri*: A missing link from facultative to obligate insect endosymbiont. *PLoS Genetics*, 7(11), e1002357. https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1002357

Laughton, A. M., Garcia, J. R., Altincicek, B., Strand, M. R., & Gerardo, N. M. (2011). Characterisation of immune responses in the pea aphid, *Acyrthosiphon pisum*. *Journal of Insect Physiology*, 57(6), 830–839. https://doi.org/10.1016/j.jinsphys.2011.03.015

Laughton, A. M., Garcia, J. R., & Gerardo, N. M. (2016). Condition-dependent alteration of cellular immunity by secondary symbionts in the pea aphid, *Acyrthosiphon pisum*. *Journal of Insect Physiology*, 86, 17–24. https://doi.org/10.1016/j.jinsphys.2015.12.005

Le Trionnaire, G., Tanguy, S., Hudaverdian, S., Gleonnec, F., Richard, G., Cayrol, B., … Tagu, D. (2019). An integrated protocol for targeted mutagenesis with CRISPR-Cas9 system in the pea aphid. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 110, 34–44. https://doi.org/10.1016/j.ibmb.2019.04.016

Thèse accessible à l'adresse : https://theses.insa-lyon.fr/publication/2025ISAL0089/these.pdf © [H. Terrasson], [2025], INSA Lyon, tous droits réservés

Leclair, M., Buchard, C., Mahéo, F., Simon, J.-C., & Outreman, Y. (2021). A link between communities of protective endosymbionts and parasitoids of the pea aphid revealed in unmanipulated agricultural systems. *Frontiers in Ecology and Evolution*, 9. https://doi.org/10.3389/fevo.2021.618331

Lee, J. B., Park, K.-E., Lee, S. A., Jang, S. H., Eo, H. J., Jang, H. A., … Lee, B. L. (2017). Gut symbiotic bacteria stimulate insect growth and egg production by modulating hexamerin and vitellogenin gene expression. *Developmental & Comparative Immunology*, 69, 12–22. https://doi.org/10.1016/j.dci.2016.11.019

Le-Feuvre, R. R., Ramírez, C. C., Olea, N., & Meza-Basso, L. (2007). Effect of the antimicrobial peptide indolicidin on the green peach aphid *Myzus persicae* (Sulzer). *Journal of Applied Entomology*, 131(2), 71–75. https://doi.org/10.1111/j.1439-0418.2006.01117.x

Lemaitre, B., & Hoffmann, J. (2007). The host defense of *Drosophila melanogaster*. *Annual Review of Immunology*, 25, 697–743. https://doi.org/10.1146/annurev.immunol.25.022106.141615

Lemoine, M. M., Engl, T., & Kaltenpoth, M. (2020). Microbial symbionts expanding or constraining abiotic niche space in insects. *Current Opinion in Insect Science*, 39, 14–20. https://doi.org/10.1016/j.cois.2020.01.003

Li, H., Sosa-Calvo, J., Horn, H. A., Pupo, M. T., Clardy, J., Rabeling, C., … Currie, C. R. (2018). Convergent evolution of complex structures for ant–bacterial defensive symbiosis in fungus-farming ants. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 115(42), 10720–10725. https://doi.org/10.1073/pnas.1809332115

Li, Q., Sun, J., Qin, Y., Fan, J., Zhang, Y., Tan, X., … Chen, J. (2021). Reduced insecticide susceptibility of the wheat aphid after infection by the secondary bacterial symbiont *Hamiltonella defensa*. *Pest Management Science*, 77(4), 1936–1944. https://doi.org/10.1002/ps.6221

Li, Y.-H., Peng, J., Wu, Q.-J., Sun, J.-C., Zhang, P.-J., & Qiu, B.-L. (2024). Transcriptome data reveal beneficial effects of *Rickettsia* (Rickettsiales: Rickettsiaceae) on *Bemisia tabaci* (Hemiptera: Aleyrodidae) through nutritional factors and defense mechanisms. *Journal of Economic Entomology*, 117(3), 817–824. https://doi.org/10.1093/jee/toae066

Liang, Y., Dikow, R. B., Su, X., Wen, J., & Ren, Z. (2024). Comparative genomics of the primary endosymbiont *Buchnera aphidicola* in aphid hosts and their coevolutionary relationships. *BMC Biology*, 22(1), 137. https://doi.org/10.1186/s12915-024-01934-w

Ligonniere, S., Bantz, A., Raymond, V., & Goven, D. (2024). Using RNA interference targeting a nicotinic acetylcholine receptor subunit to counteract insecticide accommodation mechanisms: Example of the β1 subunit in the imidacloprid-accommodated American cockroach, *Periplaneta americana*. *Journal of Pesticide Science*, 49(1), 58–64. https://doi.org/10.1584/jpestics.D23-027

Lilia, J.-P., Alvarado-Delgado, A., & Rodríguez, M. (2024). Preferential induction of canonical IMD and Toll innate immune receptors by bacterial challenges in *Triatoma pallidipennis* primed with Gram-negative and Gram positif bacteria, respectively. *Global Journal of Medical Research*, 1–11. https://doi.org/10.34257/LJMHRVOL23IS2PG1

Login, F. H., Balmand, S., Vallier, A., Vincent-Monégat, C., Vigneron, A., Weiss-Gayet, M., … Heddi, A. (2011). Antimicrobial peptides keep insect endosymbionts under control. *Science*, 334(6054), 362–365. https://doi.org/10.1126/science.1209728

López-Madrigal, S., Balmand, S., Latorre, A., Heddi, A., Moya, A., & Gil, R. (2013). How does *Tremblaya princeps* get essential proteins from its nested partner *Moranella endobia* in the mealybug *Planococcus citri*? *PLOS ONE*, 8(10), e77307. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0077307

López-Madrigal, S., Beltrá, A., Resurrección, S., Soto, A., Latorre, A., Moya, A., & Gil, R. (2014). Molecular evidence for ongoing complementarity and horizontal gene transfer in endosymbiotic systems of mealybugs. *Frontiers in Microbiology*, 5, 449. https://doi.org/10.3389/fmicb.2014.00449

Loth, K., Parisot, N., Paquet, F., Terrasson, H., Sivignon, C., Rahioui, I., … da Silva, P. (2022). Aphid BCR4 structure and activity uncover a new defensin peptide superfamily. *International Journal of Molecular Sciences*, 23(20), 12480. https://doi.org/10.3390/ijms232012480

Lu, C., Zou, T., Liu, Q., & Huang, X. (2024). Twenty-nine newly sequenced genomes and a comprehensive genome dataset for the insect endosymbiont *Buchnera*. *Scientific Data*, 11(1), 673. https://doi.org/10.1038/s41597-024-03537-0

Luan, J.-B., Chen, W., Hasegawa, D. K., Simmons, A. M., Wintermantel, W. M., Ling, K.-S., … Douglas, A. E. (2015). Metabolic coevolution in the bacterial symbiosis of whiteflies and related plant sap-feeding insects. *Genome Biology and Evolution*, 7(9), 2635–2647. https://doi.org/10.1093/gbe/evv170

Łukasik, P., van Asch, M., Guo, H., Ferrari, J., & Godfray, H. C. J. (2013). Unrelated facultative endosymbionts protect aphids against a fungal pathogen. *Ecology Letters*, 16(2), 214–228. https://doi.org/10.1111/ele.12031

Luna-Ramirez, K., Skaljac, M., Grotmann, J., Kirfel, P., & Vilcinskas, A. (2017). Orally delivered scorpion antimicrobial peptides exhibit activity against pea aphid (*Acyrthosiphon pisum*) and its bacterial symbionts. *Toxins*, 9(9), 261. https://doi.org/10.3390/toxins9090261

Thèse accessible à l'adresse : https://theses.insa-lyon.fr/publication/2025ISAL0089/these.pdf © [H. Terrasson], [2025], INSA Lyon, tous droits réservés

Luo, C., Belghazi, M., Schmitz, A., Lemauf, S., Desneux, N., Simon, J.-C., … Gatti, J.-L. (2021). Hosting certain facultative symbionts modulates the phenoloxidase activity and immune response of the pea aphid *Acyrthosiphon pisum*. *Insect Science*, 28(6), 1780–1799. https://doi.org/10.1111/1744-7917.12888

Ma, D., Storelli, G., Mitchell, M., & Leulier, F. (2015). Studying host-microbiota mutualism in *Drosophila*: Harnessing the power of gnotobiotic flies. *Biomedical Journal*, 38(4), 285–293. https://doi.org/10.4103/2319-4170.158620

Ma, L., Liu, L., Zhao, Y., Yang, L., Chen, C., Li, Z., & Lu, Z. (2020). JNK pathway plays a key role in the immune system of the pea aphid and is regulated by microRNA-184. *PLOS Pathogens*, 16(6), e1008627. https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1008627

Ma, L., Liu, S., Lu, P., Yan, X., Hao, C., Wang, H., … Lu, Z. (2022). The IMD pathway in Hemipteran: A comparative analysis and discussion. *Developmental & Comparative Immunology*, 136, 104513. https://doi.org/10.1016/j.dci.2022.104513

Ma, L., Liu, Y., Sun, J., Yang, X., He, Y., Zhang, T., … Qie, X. (2025). The synthesis of nitric oxide regulated by JNK pathway in the pea aphid to defend against bacterial infection. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 180, 104315. https://doi.org/10.1016/j.ibmb.2025.104315

Maeda, G. P., Kelly, M. K., Sundar, A., & Moran, N. A. (2024). Intracellular defensive symbiont is culturable and capable of transovarial, vertical transmission. *mBio*, 15(6), e03253-23. https://doi.org/10.1128/mbio.03253-23

Maire, J., Vincent-Monégat, C., Balmand, S., Vallier, A., Hervé, M., Masson, F., … Heddi, A. (2019). Weevil *pgrp-lb* prevents endosymbiont TCT dissemination and chronic host systemic immune activation. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 116(12), 5623–5632. https://doi.org/10.1073/pnas.1821806116

Maire, J., Parisot, N., Galvao Ferrarini, M., Vallier, A., Gillet, B., Hughes, S., … Heddi, A. (2020). Spatial and morphological reorganization of endosymbiosis during metamorphosis accommodates adult metabolic requirements in a weevil. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 117(32), 19347–19358. https://doi.org/10.1073/pnas.2007151117

Man, Y., Li, D., Wang, M., Hu, Z., Gatti, J.-L., Desneux, N., … Luo, C. (2023). Indirect and direct interactions between grain aphid and parasitoid in the presence of symbiont *Regiella insecticola*. *CABI Agriculture and Bioscience*, 4(1), 59. https://doi.org/10.1186/s43170-023-00202-1

Manzano-Marín, A., Szabó, G., Simon, J.-C., Horn, M., & Latorre, A. (2017). Happens in the best of subfamilies: Establishment and repeated replacements of co-obligate secondary endosymbionts within Lachninae aphids. *Environmental Microbiology*, 19(1), 393–408. https://doi.org/10.1111/1462-2920.13633

Manzano-Marín, A., Coeur d'acier, A., Clamens, A.-L., Cruaud, C., Barbe, V., & Jousselin, E. (2023). Co-obligate symbioses have repeatedly evolved across aphids, but partner identity and nutritional contributions vary across lineages. *Peer Community Journal*, 3. https://doi.org/10.24072/pcjournal.278

Manzano-Marín A, Coeur d'acier A, Clamens A-L, et al (2020) Serial horizontal transfer of vitamin-biosynthetic genes enables the establishment of new nutritional symbionts in aphids' di-symbiotic systems. The ISME Journal 14:259–273. https://www.doi.org/10.1038/s41396-019-0533-6

Marra, A., Hanson, M. A., Kondo, S., Erkosar, B., & Lemaitre, B. (2021). *Drosophila* Antimicrobial Peptides and Lysozymes Regulate Gut Microbiota Composition and Abundance. *mBio*, 12(4), 10.1128/mbio.00824-21. https://doi.org/10.1128/mbio.00824-21

Martin, M., Hiroyasu, A., Guzman, R. M., Roberts, S. A., & Goodman, A. G. (2018). Analysis of *Drosophila* STING Reveals an Evolutionarily Conserved Antimicrobial Function. *Cell Reports*, 23(12), 3537-3550.e6. https://doi.org/10.1016/j.celrep.2018.05.029

Martins, M., César, C. S., & Cogni, R. (2023). The effects of temperature on prevalence of facultative insect heritable symbionts across spatial and seasonal scales. *Frontiers in Microbiology*, 14. https://doi.org/10.3389/fmicb.2023.1321341

Marx, H., Minogue, C. E., Jayaraman, D., Richards, A. L., Kwiecien, N. W., Siahpirani, A. F., … Coon, J. J. (2016). A proteomic atlas of the legume *Medicago truncatula* and its nitrogen-fixing endosymbiont *Sinorhizobium meliloti*. *Nature Biotechnology*, 34(11), 1198–1205. https://doi.org/10.1038/nbt.3681

Mason, C. J., & Shikano, I. (2023). Hotter days, stronger immunity? Exploring the impact of rising temperatures on insect gut health and microbial relationships. *Current Opinion in Insect Science*, 59, 101096. https://doi.org/10.1016/j.cois.2023.101096

Masson, F., Moné, Y., Vigneron, A., Vallier, A., Parisot, N., Vincent-Monégat, C., … Heddi, A. (2015). Weevil endosymbiont dynamics is associated with a clamping of immunity. *BMC Genomics*, 16(1), 819. https://doi.org/10.1186/s12864-015-2048-5

Masson, F., Zaidman-Rémy, A., & Heddi, A. (2016). Antimicrobial peptides and cell processes tracking endosymbiont dynamics. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, 371(1695), 20150298. https://doi.org/10.1098/rstb.2015.0298

Matsuura, Y., Kikuchi, Y., Miura, T., & Fukatsu, T. (2015). Ultrabithorax is essential for bacteriocyte development. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 112(30), 9376–9381. https://doi.org/10.1073/pnas.1503371112

McCutcheon, J. P., & Moran, N. A. (2007). Parallel genomic evolution and metabolic interdependence in an ancient symbiosis.

Thèse accessible à l'adresse : https://theses.insa-lyon.fr/publication/2025ISAL0089/these.pdf © [H. Terrasson], [2025], INSA Lyon, tous droits réservés

Proceedings of the National Academy of Sciences, 104(49), 19392–19397. https://doi.org/10.1073/pnas.0708855104

McCutcheon, J. P., McDonald, B. R., & Moran, N. A. (2009). Convergent evolution of metabolic roles in bacterial co-symbionts of insects. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 106(36), 15394–15399. https://doi.org/10.1073/pnas.0906424106

McCutcheon, J. P. (2010). The bacterial essence of tiny symbiont genomes. *Current Opinion in Microbiology*, 13(1), 73–78. https://doi.org/10.1016/j.mib.2009.12.002

McCutcheon, J. P., & Moran, N. A. (2010). Functional convergence in reduced genomes of bacterial symbionts spanning 200 My of evolution. *Genome Biology and Evolution*, 2, 708–718. https://doi.org/10.1093/gbe/evq055

McCutcheon, J. P., & Moran, N. A. (2012). Extreme genome reduction in symbiotic bacteria. *Nature Reviews Microbiology*, 10(1), 13–26. https://doi.org/10.1038/nrmicro2670

Mergaert, P., Nikovics, K., Kelemen, Z., Maunoury, N., Vaubert, D., Kondorosi, A., & Kondorosi, E. (2003). A Novel Family in *Medicago truncatula* Consisting of More Than 300 Nodule-Specific Genes Coding for Small, Secreted Polypeptides with Conserved Cysteine Motifs. *Plant Physiology*, 132(1), 161–173. https://doi.org/10.1104/pp.102.018192

Mergaert, P., Uchiumi, T., Alunni, B., Evanno, G., Cheron, A., Catrice, O., … Kondorosi, E. (2006). Eukaryotic control on bacterial cell cycle and differentiation in the Rhizobium-legume symbiosis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 103(13), 5230–5235. https://doi.org/10.1073/pnas.0600912103

Mergaert, Peter, & Kondorosi, E. (2012). Controlling Symbiotic Microbes with Antimicrobial Peptides. In *ACS Symposium Series: Vol. 1095. Small Wonders: Peptides for Disease Control* (Vol. 1095, pp. 215–233). American Chemical Society. https://doi.org/10.1021/bk-2012-1095.ch011

Mergaert, P., Kikuchi, Y., Shigenobu, S., & Nowack, E. C. M. (2017). Metabolic Integration of Bacterial Endosymbionts through Antimicrobial Peptides. *Trends in Microbiology*, 25(9), 703–712. https://doi.org/10.1016/j.tim.2017.04.007

Mergaert, P. (2018). Role of antimicrobial peptides in controlling symbiotic bacterial populations. *Natural Product Reports*, 35(4), 336–356. https://doi.org/10.1039/C7NP00056A

Mestre, A., Poulin, R., & Hortal, J. (2020). A niche perspective on the range expansion of symbionts. *Biological Reviews*, *95*(2), 491–516. https://doi.org/10.1111/brv.12574

Michalik, A., Szklarzewicz, T., Jankowska, W., & Wieczorek, K. (2014). Endosymbiotic microorganisms of aphids (Hemiptera: Sternorrhyncha: Aphidoidea): Ultrastructure, distribution and transovarial transmission. *EJE*, 111(1), 91–104. https://doi.org/10.14411/eje.2014.011

Michalik, K., Szklarzewicz, T., Kalandyk-Kołodziejczyk, M., Jankowska, W., & Michalik, A. (2016). Bacteria belonging to the genus *Burkholderia* are obligatory symbionts of the eriococcids *Acanthococcus aceris* Signoret, 1875 and *Gossyparia spuria* (Modeer, 1778) (Insecta, Hemiptera, Coccoidea). *Arthropod Structure & Development*, 45(3), 265–272. https://doi.org/10.1016/j.asd.2016.04.002

Mikaelyan, A., Strassert, J. F. H., Tokuda, G., & Brune, A. (2014). The fibre-associated cellulolytic bacterial community in the hindgut of wood-feeding higher termites (*asutitermes* spp.). *Environmental Microbiology*, 16(9), 2711–2722. https://doi.org/10.1111/1462-2920.12425

Misof, B., Liu, S., Meusemann, K., Peters, R. S., Donath, A., Mayer, C., … Zhou, X. (2014). Phylogenomics resolves the timing and pattern of insect evolution. *Science (New York, N.Y.)*, 346(6210), 763–767. https://doi.org/10.1126/science.1257570

Miura, T., Braendle, C., Shingleton, A., Sisk, G., Kambhampati, S., & Stern, D. L. (2003). A comparison of parthenogenetic and sexual embryogenesis of the pea aphid *Acyrthosiphon pisum* (Hemiptera: Aphidoidea). *Journal of Experimental Zoology Part B: Molecular and Developmental Evolution*, 295B(1), 59–81. https://doi.org/10.1002/jez.b.3

Monnin, D., Jackson, R., Kiers, E. T., Bunker, M., Ellers, J., & Henry, L. M. (2020). Parallel evolution in the integration of a co-obligate aphid symbiosis. *Current Biology*, 30(10), 1949-1957.e6. https://doi.org/10.1016/j.cub.2020.03.011

Montiel, J., Downie, J. A., Farkas, A., Bihari, P., Herczeg, R., Bálint, B., … Kondorosi, É. (2017). Morphotype of bacteroids in different legumes correlates with the number and type of symbiotic NCR peptides. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 114(19), 5041–5046. https://doi.org/10.1073/pnas.1704217114

Montllor, C. B., Maxmen, A., & Purcell, A. H. (2002). Facultative bacterial endosymbionts benefit pea aphids *Acyrthosiphon pisum* under heat stress. *Ecological Entomology*, 27(2), 189–195. https://doi.org/10.1046/j.1365-2311.2002.00393.x

Moran, N. A. (1996). Accelerated evolution and Muller's rachet in endosymbiotic bacteria. *Proceedings of the National Academy of*

Thèse accessible à l'adresse : https://theses.insa-lyon.fr/publication/2025ISAL0089/these.pdf © [H. Terrasson], [2025], INSA Lyon, tous droits réservés

Sciences, 93(7), 2873–2878. https://doi.org/10.1073/pnas.93.7.2873

Moran, N. A., Munson, M. A., Baumann, P., & Ishikawa, H. (1997). A molecular clock in endosymbiotic bacteria is calibrated using the insect hosts. *Proceedings of the Royal Society of London. Series B: Biological Sciences*, 253(1337), 167–171. https://doi.org/10.1098/rspb.1993.0098

Moran, N. A., Tran, P., & Gerardo, N. M. (2005a). Symbiosis and insect diversification: An ancient symbiont of sap-feeding insects from the bacterial phylum Bacteroidetes. *Applied and Environmental Microbiology*, 71(12), 8802–8810. https://doi.org/10.1128/AEM.71.12.8802-8810.2005

Moran, N. A., Russell, J. A., Koga, R., & Fukatsu, T. (2005b). Evolutionary relationships of three new species of *Enterobacteriaceae* living as symbionts of aphids and other insects. *Applied and Environmental Microbiology*, 71(6), 3302–3310. https://doi.org/10.1128/AEM.71.6.3302-3310.2005

Moran, N. A., McCutcheon, J. P., & Nakabachi, A. (2008). Genomics and evolution of heritable bacterial symbionts. *Annual Review of Genetics*, 42, 165–190. https://doi.org/10.1146/annurev.genet.41.110306.130119

Moriyama, M., Nikoh, N., Hosokawa, T., & Fukatsu, T. (2015). Riboflavin provisioning underlies *Wolbachia*'s fitness contribution to its insect host. *mBio*, 6(6), e01732-15. https://doi.org/10.1128/mbio.01732-15

Moriyama, M., Nishide, Y., Toyoda, A., Itoh, T., & Fukatsu, T. (2023). Complete genomes of mutualistic bacterial co-symbionts "*Candidatus Sulcia muelleri*" and "*Candidatus Nasuia deltocephalinicola*" of the rice green leafhopper *Nephotettix cincticeps*. *Microbiology Resource Announcements*, 12(9), e00353-23. https://doi.org/10.1128/MRA.00353-23

Motta, E. V. S., Mak, M., De Jong, T. K., Powell, J. E., O'Donnell, A., Suhr, K. J., … Moran, N. A. (2020). Oral or topical exposure to glyphosate in herbicide formulation impacts the gut microbiota and survival rates of honey bees. *Applied and Environmental Microbiology*, 86(18), e01150-20. https://doi.org/10.1128/AEM.01150-20

Motta, E. V. S., & Moran, N. A. (2024). The honeybee microbiota and its impact on health and disease. *Nature Reviews Microbiology*, 22(3), 122–137. https://doi.org/10.1038/s41579-023-00990-3

Mouton, L., Henri, H., Romba, R., Belgaidi, Z., Gnankiné, O., & Vavre, F. (2022). Analyses of symbiotic bacterial communities in the plant pest *Bemisia tabaci* reveal high prevalence of *Candidatus Hemipteriphilus asiaticus* on the African continent. *Peer Community Journal*, 2. https://doi.org/10.24072/pcjournal.103

Munson, M. A., Baumann, P., Clark, M. A., Baumann, L., Moran, N. A., Voegtlin, D. J., & Campbell, B. C. (1991). Evidence for the establishment of aphid-eubacterium endosymbiosis in an ancestor of four aphid families. *Journal of Bacteriology*, 173(20), 6321–6324. https://doi.org/10.1128/jb.173.20.6321-6324.1991

Myllymäki, H., & Rämet, M. (2014). JAK/STAT pathway in *Drosophila* immunity. *Scandinavian Journal of Immunology*, 79(6), 377–385. https://doi.org/10.1111/sji.12170

Nalepa, C. A. (2020). Origin of Mutualism Between Termites and Flagellated Gut Protists: Transition From Horizontal to Vertical Transmission. *Frontiers in Ecology and Evolution*, *8*. https://doi.org/10.3389/fevo.2020.00014

Nakabachi, A., & Ishikawa, H. (1999). Provision of riboflavin to the host aphid, *Acyrthosiphon pisum*, by endosymbiotic bacteria, *Buchnera*. *Journal of Insect Physiology*, 45(1), 1–6. https://doi.org/10.1016/s0022-1910(98)00104-8

Nakabachi, A., Shigenobu, S., Sakazume, N., Shiraki, T., Hayashizaki, Y., Carninci, P., … Fukatsu, T. (2005). Transcriptome analysis of the aphid bacteriocyte, the symbiotic host cell that harbors an endocellular mutualistic bacterium, *Buchnera*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 102(15), 5477–5482. https://doi.org/10.1073/pnas.0409034102

Nakabachi, A., Ueoka, R., Oshima, K., Teta, R., Mangoni, A., Gurgui, M., … Fukatsu, T. (2013). Defensive bacteriome symbiont with a drastically reduced genome. *Current Biology*, 23(15), 1478–1484. https://doi.org/10.1016/j.cub.2013.06.027

Nakabachi, A., Piel, J., Malenovský, I., & Hirose, Y. (2020). Comparative genomics underlines multiple roles of *Profftella*, an obligate symbiont of psyllids: Providing toxins, vitamins, and carotenoids. *Genome Biology and Evolution*, 12(11), 1975–1987. https://doi.org/10.1093/gbe/evaa175

Nardon, P. (1973). Obtention d'une souche asymbiotique chez le charançon *Sitophilus sasakii* Tak: Différentes méthodes d'obtention et comparaison avec la souche symbiotique d'origine. *CR Acad Sci Paris D*, 277, 981–984.

Nishide, Y., Kageyama, D., Yokoi, K., Jouraku, A., Tanaka, H., Futahashi, R., & Fukatsu, T. (2019). Functional crosstalk across IMD and Toll pathways: Insight into the evolution of incomplete immune cascades. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, 286(1897), 20182207. https://doi.org/10.1098/rspb.2018.2207

Nozaki, T., & Shigenobu, S. (2022). Ploidy dynamics in aphid host cells harboring bacterial symbionts. *Scientific Reports*, 12(1), 9111.

Thèse accessible à l'adresse : https://theses.insa-lyon.fr/publication/2025ISAL0089/these.pdf © [H. Terrasson], [2025], INSA Lyon, tous droits réservés

https://doi.org/10.1038/s41598-022-12836-8

Ohbayashi, T., Futahashi, R., Terashima, M., Barrière, Q., Lamouche, F., Takeshita, K., … Kikuchi, Y. (2019). Comparative cytology, physiology and transcriptomics of *Burkholderia insecticola* in symbiosis with the bean bug *Riptortus pedestris* and in culture. *The ISME Journal*, 13(6), 1469–1483. https://doi.org/10.1038/s41396-019-0361-8

Oliver, K. M., Russell, J. A., Moran, N. A., & Hunter, M. S. (2003). Facultative bacterial symbionts in aphids confer resistance to parasitic wasps. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 100(4), 1803–1807. https://doi.org/10.1073/pnas.0335320100

Oliver, K. M., Moran, N. A., & Hunter, M. S. (2005). Variation in resistance to parasitism in aphids is due to symbionts not host genotype. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 102(36), 12795–12800. https://doi.org/10.1073/pnas.0506131102

Oliver, K. M., Moran, N. A., & Hunter, M. S. (2006). Costs and benefits of a superinfection of facultative symbionts in aphids. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, 273(1591), 1273–1280. https://doi.org/10.1098/rspb.2005.3436

Oliver, K. M., Campos, J., Moran, N. A., & Hunter, M. S. (2008). Population dynamics of defensive symbionts in aphids. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, 275(1632), 293–299. https://doi.org/10.1098/rspb.2007.1192

Oliver, K. M., Smith, A. H., & Russell, J. A. (2014). Defensive symbiosis in the real world – advancing ecological studies of heritable, protective bacteria in aphids and beyond. *Functional Ecology*, 28(2), 341–355. https://doi.org/10.1111/1365-2435.12133

Opatovsky, I., Santos-Garcia, D., Ruan, Z., Lahav, T., Ofaim, S., Mouton, L., … Freilich, S. (2018). Modeling trophic dependencies and exchanges among insects' bacterial symbionts in a host-simulated environment. *BMC Genomics*, 19(1), 402. https://doi.org/10.1186/s12864-018-4786-7

Owji, H., Nezafat, N., Negahdaripour, M., Hajiebrahimi, A., & Ghasemi, Y. (2018). A comprehensive review of signal peptides: Structure, roles, and applications. *European Journal of Cell Biology*, 97(6), 422–441. https://doi.org/10.1016/j.ejcb.2018.06.003

Pais, I. S., Valente, R. S., Sporniak, M., & Teixeira, L. (2018). *Drosophila melanogaster* establishes a species-specific mutualistic interaction with stable gut-colonizing bacteria. *PLoS Biology*, 16(7), e2005710. https://doi.org/10.1371/journal.pbio.2005710

Parisot, N., Vargas-Chávez, C., Goubert, C., Baa-Puyoulet, P., Balmand, S., Beranger, L., … Heddi, A. (2021). The transposable element-rich genome of the cereal pest *Sitophilus oryzae*. *BMC Biology*, 19(1), 241. https://doi.org/10.1186/s12915-021-01158-2

Parker, B. J., Hrček, J., McLean, A. H. C., Brisson, J. A., & Godfray, H. C. J. (2021). Intraspecific variation in symbiont density in an insect–microbe symbiosis. *Molecular Ecology*, 30(6), 1559–1569. https://doi.org/10.1111/mec.15821

Parkinson, J. F., Gobin, B., & Hughes, W. O. H. (2017). The more, the merrier? Obligate symbiont density changes over time under controlled environmental conditions, yet holds no clear fitness consequences. *Physiological Entomology*, 42(2), 163–172. https://doi.org/10.1111/phen.12186

Patiño-Navarrete, R., Moya, A., Latorre, A., & Peretó, J. (2013). Comparative genomics of *Blattabacterium cuenoti*: The frozen legacy of an ancient endosymbiont genome. *Genome Biology and Evolution*, 5(2), 351–361. https://doi.org/10.1093/gbe/evt011

Penterman, J., Abo, R. P., De Nisco, N. J., Arnold, M. F. F., Longhi, R., Zanda, M., & Walker, G. C. (2014). Host plant peptides elicit a transcriptional response to control the *Sinorhizobium meliloti* cell cycle during symbiosis. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 111(9), 3561–3566. https://doi.org/10.1073/pnas.1400450111

Pillai-Kastoori, L., Heaton, S., Shiflett, S. D., Roberts, A. C., Solache, A., & Schutz-Geschwender, A. R. (2020). Antibody validation for western blot: By the user, for the user. *Journal of Biological Chemistry*, 295(4), 926–939. https://doi.org/10.1016/S0021-9258(17)49905-4

Poulain, M., Rosinski, E., Henri, H., Balmand, S., Delignette-Muller, M.-L., Heddi, A., … Kremer, N. (2024). Development, feeding, and sex shape the relative quantity of the nutritional obligatory symbiont *Wolbachia* in bed bugs. *Frontiers in Microbiology*, 15. https://doi.org/10.3389/fmicb.2024.1386458

Powell, J. E., Martinson, V. G., Urban-Mead, K., & Moran, N. A. (2014). Routes of Acquisition of the Gut Microbiota of the Honey Bee Apis mellifera. *Applied and Environmental Microbiology*, *80*(23), 7378–7387. https://doi.org/10.1128/AEM.01861-14

Powell, E., Ratnayeke, N., & Moran, N. A. (2016). Strain diversity and host specificity in a specialized gut symbiont of honeybees and bumblebees. *Molecular Ecology*, 25(18), 4461–4471. https://doi.org/10.1111/mec.13787

Pramono, A. K., Kuwahara, H., Itoh, T., Toyoda, A., Yamada, A., & Hongoh, Y. (2017). Discovery and complete genome sequence of a bacteriophage from an obligate intracellular symbiont of a cellulolytic protist in the termite gut. *Microbes and Environments*, 32(2), 112–117. https://doi.org/10.1264/jsme2.ME16175

Prell, J., & Poole, P. (2006). Metabolic changes of rhizobia in legume nodules. *Trends in Microbiology*, 14(4), 161–168.

Thèse accessible à l'adresse : https://theses.insa-lyon.fr/publication/2025ISAL0089/these.pdf © [H. Terrasson], [2025], INSA Lyon, tous droits réservés

https://doi.org/10.1016/j.tim.2006.02.005

Rabatel, A., Febvay, G., Gaget, K., Duport, G., Baa-Puyoulet, P., Sapountzis, P., … Colella, S. (2013). Tyrosine pathway regulation is host-mediated in the pea aphid symbiosis during late embryonic and early larval development. *BMC Genomics*, 14(1), 235. https://doi.org/10.1186/1471-2164-14-235

Rabouille, C. (2017). Pathways of Unconventional Protein Secretion. *Trends in Cell Biology*, *27*(3), 230–240. https://doi.org/10.1016/j.tcb.2016.11.007

Rahbé, Y., Deraison, C., Bonadé-Bottino, M., Girard, C., Nardon, C., & Jouanin, L. (2003). Effects of the cysteine protease inhibitor oryzacystatin (OC-I) on different aphids and reduced performance of *Myzus persicae* on OC-I expressing transgenic oilseed rape. *Plant Science*, 164(4), 441–450. https://doi.org/10.1016/S0168-9452(02)00402-8

Rahioui, I., Eyraud, V., Karaki, L., Sasse, F., Carre-Pierrat, M., Qin, A., … Gressent, F. (2014). Host range of the potential biopesticide pea albumin 1b (PA1b) is limited to insects. *Toxicon: Official Journal of the International Society on Toxinology*, 89, 67–76. https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2014.07.004

Raina, H. S., Rawal, V., Singh, S., Daimei, G., Shakarad, M., & Rajagopal, R. (2015). Elimination of *Arsenophonus* and decrease in the bacterial symbionts diversity by antibiotic treatment leads to increase in fitness of whitefly, *Bemisia tabaci*. *Infection, Genetics and Evolution*, 32, 224–230. https://doi.org/10.1016/j.meegid.2015.03.022

Raymann, K., Shaffer, Z., & Moran, N. A. (2017). Antibiotic exposure perturbs the gut microbiota and elevates mortality in honeybees. *PLOS Biology*, 15(3), e2001861. https://doi.org/10.1371/journal.pbio.2001861

Renoz, F., Noël, C., Errachid, A., Foray, V., & Hance, T. (2015). Infection dynamic of symbiotic bacteria in the pea aphid *Acyrthosiphon pisum* gut and host immune response at the early steps in the infection process. *PLOS ONE*, 10(3), e0122099. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0122099

Renoz, F., Lopes, M. R., Gaget, K., Duport, G., Eloy, M.-C., Geelhand de Merxem, B., … Calevro, F. (2022a). Compartmentalized into bacteriocytes but highly invasive: The puzzling case of the co-obligate symbiont *Serratia symbiotica* in the aphid *Periphyllus lyropictus*. *Microbiology Spectrum*, 10(3), e00457-22. https://doi.org/10.1128/spectrum.00457-22

Renoz, F., Ambroise, J., Bearzatto, B., Fakhour, S., Parisot, N., Ribeiro Lopes, M., … Hance, T. (2022b). The di-symbiotic systems in the aphids *Sipha maydis* and *Periphyllus lyropictus* provide a contrasting picture of recent co-obligate nutritional endosymbiosis in aphids. *Microorganisms*, 10(7), 1360. https://doi.org/10.3390/microorganisms10071360

Renoz, F. (2024). The nutritional dimension of facultative bacterial symbiosis in aphids: Current status and methodological considerations for future research. *Current Research in Insect Science*, 5, 100070. https://doi.org/10.1016/j.cris.2023.100070

Ribeiro Lopes, M., Parisot, N., Gaget, K., Huygens, C., Peignier, S., Duport, G., … Calevro, F. (2020). Evolutionary novelty in the apoptotic pathway of aphids. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 117(51), 32545–32556. https://doi.org/10.1073/pnas.2013847117

Ribeiro Lopes, M., Simonet, P., Duport, G., Gaget, K., Balmand, S., Sugio, A., … Calevro, F. (2021). Isolation of insect bacteriocytes as a platform for transcriptomic analyses. *Methods in Molecular Biology (Clifton, N.J.)*, 2170, 185–198. https://doi.org/10.1007/978-1-0716-0743-5_13

Ribeiro Lopes, M., Gaget, K., Renoz, F., Duport, G., Balmand, S., Charles, H., … Calevro, F. (2022). Bacteriocyte plasticity in pea aphids facing amino acid stress or starvation during development. *Frontiers in Physiology*, 13. https://doi.org/10.3389/fphys.2022.982920

Rio, R. V. M., Symula, R. E., Wang, J., Lohs, C., Wu, Y., Snyder, A. K., … Aksoy, S. (2012). Insight into the transmission biology and species-specific functional capabilities of tsetse (Diptera: Glossinidae) obligate symbiont *Wigglesworthia*. *mBio*, 3(1), e00240-11. https://doi.org/10.1128/mBio.00240-11

Rosenfeld, Y., & Shai, Y. (2006). Lipopolysaccharide (endotoxin)-host defense antibacterial peptides interactions: Role in bacterial resistance and prevention of sepsis. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes*, 1758(9), 1513–1522. https://doi.org/10.1016/j.bbamem.2006.05.017

Roux, B., Rodde, N., Jardinaud, M.-F., Timmers, T., Sauviac, L., Cottret, L., … Gamas, P. (2014). An integrated analysis of plant and bacterial gene expression in symbiotic root nodules using laser-capture microdissection coupled to RNA sequencing. *The Plant Journal*, 77(6), 817–837. https://doi.org/10.1111/tpj.12442

Roy, P., Achom, M., Wilkinson, H., Lagunas, B., & Gifford, M. L. (2020). Symbiotic outcome modified by the diversification from 7

Thèse accessible à l'adresse : https://theses.insa-lyon.fr/publication/2025ISAL0089/these.pdf © [H. Terrasson], [2025], INSA Lyon, tous droits réservés

to over 700 nodule-specific cysteine-rich peptides. *Genes*, 11(4), 348. https://doi.org/10.3390/genes11040348

Russell, J. A., & Moran, N. A. (2006). Costs and benefits of symbiont infection in aphids: Variation among symbionts and across temperatures. *Proceedings. Biological Sciences*, 273(1586), 603–6010. https://doi.org/10.1098/rspb.2005.3348

Sabree, Z. L., Huang, C. Y., Arakawa, G., Tokuda, G., Lo, N., Watanabe, H., & Moran, N. A. (2012). Genome shrinkage and loss of nutrient-providing potential in the obligate symbiont of the primitive termite *Mastotermes darwiniensis*. *Applied and Environmental Microbiology*, 78(1), 204–210. https://doi.org/10.1128/AEM.06540-11

Sachs, J. L., Russell, J. E., Lii, Y. E., Black, K. C., Lopez, G., & Patil, A. S. (2010). Host control over infection and proliferation of a cheater symbiont. *Journal of Evolutionary Biology*, 23(9), 1919–1927. https://doi.org/10.1111/j.1420-9101.2010.02056.x

Saifi, F., Biró, J. B., Horváth, B., Vizler, C., Laczi, K., Rákhely, G., … Kaló, P. (2024). Two members of a Nodule-specific Cysteine-Rich (NCR) peptide gene cluster are required for differentiation of rhizobia in Medicago truncatula nodules. *The Plant Journal*, *119*(3), 1508–1525. https://doi.org/10.1111/tpj.16871

Sakurai, M., Koga, R., Tsuchida, T., Meng, X.-Y., & Fukatsu, T. (2005). *Rickettsia* symbiont in the pea aphid *Acyrthosiphon pisum*: Novel cellular tropism, effect on host fitness, and interaction with the essential symbiont *Buchnera*. *Applied and Environmental Microbiology*, 71(7), 4069–4075. https://doi.org/10.1128/AEM.71.7.4069-4075.2005

Salem, H., Bauer, E., Strauss, A. S., Vogel, H., Marz, M., & Kaltenpoth, M. (2014). Vitamin supplementation by gut symbionts ensures metabolic homeostasis in an insect host. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, 281(1796), 20141838. https://doi.org/10.1098/rspb.2014.1838

Salem, H., Florez, L., Gerardo, N., & Kaltenpoth, M. (2015). An out-of-body experience: The extracellular dimension for the transmission of mutualistic bacteria in insects. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, 282(1804), 20142957. https://doi.org/10.1098/rspb.2014.2957

Sandström, J., & Pettersson, J. (1994). Amino acid composition of phloem sap and the relation to intraspecific variation in pea aphid (*Acyrthosiphon pisum*) performance. *Journal of Insect Physiology*, 40(11), 947–955. https://doi.org/10.1016/0022-1910(94)90133-3

Santos-Garcia, D., Juravel, K., Freilich, S., Zchori-Fein, E., Latorre, A., Moya, A., … Silva, F. J. (2018). To B or not to B: Comparative genomics suggests *Arsenophonus* as a source of B vitamins in whiteflies. *Frontiers in Microbiology*, 9, 2254. https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.02254

Sapountzis, P., Duport, G., Balmand, S., Gaget, K., Jaubert-Possamai, S., Febvay, G., … Calevro, F. (2014). New insight into the RNA interference response against cathepsin-L gene in the pea aphid, *Acyrthosiphon pisum*: Molting or gut phenotypes specifically induced by injection or feeding treatments. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 51, 20–32. https://doi.org/10.1016/j.ibmb.2014.05.005

Sasaki-Fukatsu, K., Koga, R., Nikoh, N., Yoshizawa, K., Kasai, S., Mihara, M., … Fukatsu, T. (2006). Symbiotic bacteria associated with stomach discs of human lice. *Applied and Environmental Microbiology*, 72(11), 7349–7352. https://doi.org/10.1128/AEM.01429-06

Scarborough, C. L., Ferrari, J., & Godfray, H. C. J. (2005). Aphid protected from pathogen by endosymbiont. *Science*, 310(5755), 1781–1781. https://doi.org/10.1126/science.1120180

Schmidt, K., & Engel, P. (2021). Mechanisms underlying gut microbiota–host interactions in insects. *Journal of Experimental Biology*, 224(2), jeb207696. https://doi.org/10.1242/jeb.207696

Schmitz, A., Anselme, C., Ravallec, M., Rebuf, C., Simon, J.-C., Gatti, J.-L., & Poirié, M. (2012). The cellular immune response of the pea aphid to foreign intrusion and symbiotic challenge. *PLOS ONE*, 7(7), e42114. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0042114

Selvaraj, G., Santos-Garcia, D., Mozes-Daube, N., Medina, S., Zchori-Fein, E., & Freilich, S. (2021). An eco-systems biology approach for modeling tritrophic networks reveals the influence of dietary amino acids on symbiont dynamics of *Bemisia tabaci*. *FEMS Microbiology Ecology*, 97(9), fiab117. https://doi.org/10.1093/femsec/fiab117

Seyfi, R., Kahaki, F. A., Ebrahimi, T., Montazersaheb, S., Eyvazi, S., Babaeipour, V., & Tarhriz, V. (2020). Antimicrobial peptides (AMPs): Roles, functions and mechanism of action. *International Journal of Peptide Research and Therapeutics*, 26(3), 1451–1463. https://doi.org/10.1007/s10989-019-09946-9

Shafee, T. M. A., Lay, F. T., Hulett, M. D., & Anderson, M. A. (2016). The defensins consist of two independent, convergent protein superfamilies. *Molecular Biology and Evolution*, 33(9), 2345–2356. https://doi.org/10.1093/molbev/msw106

Shafee, T. M. A., Lay, F. T., Phan, T. K., Anderson, M. A., & Hulett, M. D. (2017). Convergent evolution of defensin sequence, structure

Thèse accessible à l'adresse : https://theses.insa-lyon.fr/publication/2025ISAL0089/these.pdf © [H. Terrasson], [2025], INSA Lyon, tous droits réservés

and function. *Cellular and Molecular Life Sciences: CMLS*, 74(4), 663–682. https://doi.org/10.1007/s00018-016-2344-5

Shai, Y. (2002). Mode of action of membrane active antimicrobial peptides. *Peptide Science*, 66(4), 236–248. https://doi.org/10.1002/bip.10260

Shan, H., Wu, W., Sun, Z., Chen, J., & Li, H. (2021). The gut microbiota of the insect infraorder *Pentatomomorpha* (Hemiptera: Heteroptera) for the light of ecology and evolution. *Microorganisms*, 9(2), 464. https://doi.org/10.3390/microorganisms9020464

Shandala, T., Woodcock, J. M., Ng, Y., Biggs, L., Skoulakis, E. M. C., Brooks, D. A., & Lopez, A. F. (2011). *Drosophila* 14-3-3ε has a crucial role in anti-microbial peptide secretion and innate immunity. *Journal of Cell Science*, 124(13), 2165–2174. https://doi.org/10.1242/jcs.080598

Shigenobu, S., Watanabe, H., Hattori, M., Sakaki, Y., & Ishikawa, H. (2000). Genome sequence of the endocellular bacterial symbiont of aphids *Buchnera* sp. APS. *Nature*, 407(6800), 81–86. https://doi.org/10.1038/35024074

Shigenobu, S., & Stern, D. L. (2013). Aphids evolved novel secreted proteins for symbiosis with bacterial endosymbiont. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, 280(1750), 20121952. https://doi.org/10.1098/rspb.2012.1952

Shigenobu, S., Yoda, S., Ohsawa, S., & Suzuki, M. (2024, December 31). Refined CRISPR/Cas9 genome editing in pea aphids uncovers the essential roles of *Laccase2* in overwintering egg adaptation (p. 2024.12.31.630862). *bioRxiv*. https://doi.org/10.1101/2024.12.31.630862

Shigenobu, S., & Yorimoto, S. (2022). Aphid hologenomics: Current status and future challenges. *Current Opinion in Insect Science*, 50, 100882. https://doi.org/10.1016/j.cois.2022.100882

Simms, E. L., Taylor, D. L., Povich, J., Shefferson, R. P., Sachs, J. L., Urbina, M., & Tausczik, Y. (2006). An empirical test of partner choice mechanisms in a wild legume–rhizobium interaction. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, 273(1582), 77–81. https://doi.org/10.1098/rspb.2005.3292

Simon, J.-C., Carré, S., Boutin, M., Prunier–Leterme, N., Sabater–Muñoz, B., Latorre, A., & Bournoville, R. (2003). Host–based divergence in populations of the pea aphid: Insights from nuclear markers and the prevalence of facultative symbionts. *Proceedings of the Royal Society of London. Series B: Biological Sciences*, 270(1525), 1703–1712. https://doi.org/10.1098/rspb.2003.2430

Simonet, P., Gaget, K., Parisot, N., Duport, G., Rey, M., Febvay, G., … Calevro, F. (2016a). Disruption of phenylalanine hydroxylase reduces adult lifespan and fecundity, and impairs embryonic development in parthenogenetic pea aphids. *Scientific Reports*, *6*, 34321. https://doi.org/10.1038/srep34321

Simonet, P., Duport, G., Gaget, K., Weiss-Gayet, M., Colella, S., Febvay, G., … Calevro, F. (2016b). Direct flow cytometry measurements reveal a fine-tuning of symbiotic cell dynamics according to the host developmental needs in aphid symbiosis. *Scientific Reports*, 6(1), 19967. https://doi.org/10.1038/srep19967

Simonet, P., Gaget, K., Balmand, S., Lopes, M. R., Parisot, N., Buhler, K., … Calevro, F. (2018). Bacteriocyte cell death in the pea aphid/*Buchnera* symbiotic system. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 115(8), E1819–E1828. https://doi.org/10.1073/pnas.1720237115

Siva-Jothy, M. T., Moret, Y., & Rolff, J. (2005). Insect immunity: an evolutionary ecology perspective. In S. J. Simpson (Ed.), *Advances in Insect Physiology* (Vol. 32, pp. 1–48). Academic Press. https://doi.org/10.1016/S0065-2806(05)32001-7

Skaljac, M., Zanic, K., Ban, S. G., Kontsedalov, S., & Ghanim, M. (2010). Co-infection and localization of secondary symbionts in two whitefly species. *BMC Microbiology*, *10*(1), 1–15. https://doi.org/10.1186/1471-2180-10-142

Skaljac, M., Kirfel, P., Grotmann, J., & Vilcinskas, A. (2018). Fitness costs of infection with *Serratia symbiotica* are associated with greater susceptibility to insecticides in the pea aphid. *Pest Management Science*, *74*(8), 1829–1836. https://doi.org/10.1002/ps.4881

Sloan, D. B., & Moran, N. A. (2012a). Endosymbiotic bacteria as a source of carotenoids in whiteflies. *Biology Letters*, *8*(6), 986–989. https://doi.org/10.1098/rsbl.2012.0664

Sloan, D. B., & Moran, N. A. (2012b). Genome reduction and co-evolution between the primary and secondary bacterial symbionts of psyllids. *Molecular Biology and Evolution*, *29*(12), 3781–3792. https://doi.org/10.1093/molbev/mss180

Sloan, D. B., & Moran, N. A. (2013). The evolution of genomic instability in the obligate endosymbionts of whiteflies. *Genome Biology and Evolution*, *5*(5), 783–793. https://doi.org/10.1093/gbe/evt044

Smith, T. A., Driscoll, T., Gillespie, J. J., & Raghavan, R. (2015). A *Coxiella*-like endosymbiont is a potential vitamin source for the lone star tick. *Genome Biology and Evolution*, *7*(3), 831–838. https://doi.org/10.1093/gbe/evv016

Sochard, C., Le Floch, M., Anton, S., Outreman, Y., & Simon, J.-C. (2021). Limited influence of gain and loss of symbionts on host

Thèse accessible à l'adresse : https://theses.insa-lyon.fr/publication/2025ISAL0089/these.pdf © [H. Terrasson], [2025], INSA Lyon, tous droits réservés

plant selection in specialized pea aphid genotypes. *Entomologia Generalis*, 39–47. https://doi.org/10.1127/entomologia/2020/1076

Song, N., Wang, M.-M., Huang, W.-C., Wu, Z.-Y., Shao, R., & Yin, X.-M. (2024). Phylogeny and evolution of hemipteran insects based on expanded genomic and transcriptomic data. *BMC Biology*, *22*(1), 190. https://doi.org/10.1186/s12915-024-01991-1

Sørensen, M. E. S., Stiller, M. L., Kröninger, L., & Nowack, E. C. M. (2025). Protein import into bacterial endosymbionts and evolving organelles. *The FEBS Journal*, *292*(12), 2992–3013. https://doi.org/10.1111/febs.17356

Steele, M. I., Motta, E. V. S., Gattu, T., Martinez, D., & Moran, N. A. (2021). The gut microbiota protects bees from invasion by a bacterial pathogen. *Microbiology Spectrum*, *9*(2), e00394-21. https://doi.org/10.1128/Spectrum.00394-21

Stonoha-Arther, C., & Wang, D. (2018). Tough love: Accommodating intracellular bacteria through directed secretion of antimicrobial peptides during the nitrogen-fixing symbiosis. *Current Opinion in Plant Biology*, *44*, 155–163. https://doi.org/10.1016/j.pbi.2018.04.017

Szabó, G., Schulz, F., Toenshoff, E. R., Volland, J.-M., Finkel, O. M., Belkin, S., & Horn, M. (2017). Convergent patterns in the evolution of mealybug symbioses involving different intrabacterial symbionts. *The ISME Journal*, *11*(3), 715–726. https://doi.org/10.1038/ismej.2016.148

Szklarzewicz, T., & Moskal, A. (2001). Ultrastructure, distribution, and transmission of endosymbionts in the whitefly *Aleurochiton aceris* Modeer (Insecta, Hemiptera, Aleyrodinea). *Protoplasma*, *218*(1–2), 45–53. https://doi.org/10.1007/BF01288359

Szklarzewicz, Teresa, Kalandyk-Kolodziejczyk, M., Kot, M., & Michalik, A. (2013). Ovary structure and transovarial transmission of endosymbiotic microorganisms in *Marchalina hellenica* (Insecta, Hemiptera, Coccomorpha: Marchalinidae). *Acta Zoologica*, *94*(2), 184–192. https://doi.org/10.1111/j.1463-6395.2011.00538.x

Szklarzewicz, Teresa, & Michalik, A. (2017). Transovarial transmission of symbionts in insects. In *Oocytes* (pp. 43–67). Springer, Cham. https://doi.org/10.1007/978-3-319-60855-6_3

Teufel, F., Almagro Armenteros, J. J., Johansen, A. R., Gíslason, M. H., Pihl, S. I., Tsirigos, K. D., … Nielsen, H. (2022). SignalP 6.0 predicts all five types of signal peptides using protein language models. *Nature Biotechnology*, *40*(7), 1023–1025. https://doi.org/10.1038/s41587-021-01156-3

Tinker, K. A., & Ottesen, E. A. (2016). The core gut microbiome of the American cockroach, *Periplaneta americana*, is stable and resilient to dietary shifts. *Applied and Environmental Microbiology*, *82*(22), 6603–6610. https://doi.org/10.1128/AEM.01837-16

Tláskal, V., Pylro, V. S., Žifčáková, L., & Baldrian, P. (2021). Ecological divergence within the enterobacterial genus *Sodalis*: from insect symbionts to inhabitants of decomposing deadwood. *Frontiers in Microbiology*, *12*. https://doi.org/10.3389/fmicb.2021.668644

Toenshoff, E. R., Gruber, D., & Horn, M. (2012). Co-evolution and symbiont replacement shaped the symbiosis between adelgids (Hemiptera: Adelgidae) and their bacterial symbionts. *Environmental Microbiology*, *14*(5), 1284–1295. https://doi.org/10.1111/j.1462-2920.2012.02712.x

Toenshoff, E. R., Szabó, G., Gruber, D., & Horn, M. (2014). The pine bark adelgid, *Pineus strobi*, contains two novel bacteriocyte-associated gammaproteobacterial symbionts. *Applied and Environmental Microbiology*, *80*(3), 878–885. https://doi.org/10.1128/AEM.03310-13

Tsuchida, T., Koga, R., Shibao, H., Matsumoto, T., & Fukatsu, T. (2002). Diversity and geographic distribution of secondary endosymbiotic bacteria in natural populations of the pea aphid, *Acyrthosiphon pisum*. *Molecular Ecology*, *11*(10), 2123–2135. https://doi.org/10.1046/j.1365-294x.2002.01606.x

Tsuchida, T., Koga, R., & Fukatsu, T. (2004). Host plant specialization governed by facultative symbiont. *Science*, *303*(5666), 1989–1989. https://doi.org/10.1126/science.1094611

Tsuchida, T., Koga, R., Meng, X. Y., Matsumoto, T., & Fukatsu, T. (2005). Characterization of a facultative endosymbiotic bacterium of the pea aphid *Acyrthosiphon pisum*. *Microbial Ecology*, *49*(1), 126–133. https://doi.org/10.1007/s00248-004-0216-2

Tsuchida, T., Koga, R., Horikawa, M., Tsunoda, T., Maoka, T., Matsumoto, S., … Fukatsu, T. (2010). Symbiotic bacterium modifies aphid body color. *Science*, *330*(6007), 1102–1104. https://doi.org/10.1126/science.1195463

Tsuchida, T., Koga, R., Fujiwara, A., & Fukatsu, T. (2014). Phenotypic effect of "*Candidatus Rickettsiella viridis*," a facultative symbiont of the pea aphid (*Acyrthosiphon pisum*), and its interaction with a coexisting symbiont. *Applied and Environmental Microbiology*, *80*(2), 525. https://doi.org/10.1128/AEM.03049-13

Uchi, N., Fukudome, M., Nozaki, N., Suzuki, M., Osuki, K.-I., Shigenobu, S., & Uchiumi, T. (2019). Antimicrobial activities of cysteine-rich peptides specific to bacteriocytes of the pea aphid *Acyrthosiphon pisum*. *Microbes and Environments*, 34(2), 155–160.

Thèse accessible à l'adresse : https://theses.insa-lyon.fr/publication/2025ISAL0089/these.pdf © [H. Terrasson], [2025], INSA Lyon, tous droits réservés

https://doi.org/10.1264/jsme2.ME18148

Van de Velde, W., Zehirov, G., Szatmari, A., Debreczeny, M., Ishihara, H., Kevei, Z., … Mergaert, P. (2010). Plant peptides govern terminal differentiation of bacteria in symbiosis. *Science*, 327(5969), 1122–1126. https://doi.org/10.1126/science.1184057

van den Bosch, T. J. M., & Welte, C. U. (2017). Detoxifying symbionts in agriculturally important pest insects. *Microbial Biotechnology*, 10(3), 531–540. https://doi.org/10.1111/1751-7915.12483

van den Heuvel, J. F. J. M., Hummelen, H., Verbeek, M., Dullemans, A. M., & van der Wilk, F. (1997). Characteristics of *Acyrthosiphon pisum* virus, a newly identified virus infecting the pea aphid. *Journal of Invertebrate Pathology*, 70(3), 169–176. https://doi.org/10.1006/jipa.1997.4691

Vavre, F., & Kremer, N. (2014). Microbial impacts on insect evolutionary diversification: From patterns to mechanisms. *Current Opinion in Insect Science*, *4*, 29–34. https://doi.org/10.1016/j.cois.2014.08.003

Vázquez-Martínez, R., Díaz-Ruiz, A., Almabouada, F., Rabanal-Ruiz, Y., Gracia-Navarro, F., & Malagón, M. M. (2012). Revisiting the regulated secretory pathway: From frogs to human. *General and Comparative Endocrinology*, 175(1), 1–9. https://doi.org/10.1016/j.ygcen.2011.08.017

Via, S. (2001). Sympatric speciation in animals: The ugly duckling grows up. *Trends in Ecology & Evolution*, 16(7), 381–390. https://doi.org/10.1016/s0169-5347(01)02188-7

Vigneron, A., Masson, F., Vallier, A., Balmand, S., Rey, M., Vincent-Monégat, C., … Heddi, A. (2014). Insects recycle endosymbionts when the benefit is over. *Current Biology*, 24(19), 2267–2273. https://doi.org/10.1016/j.cub.2014.07.065

Viñuelas, J., Febvay, G., Duport, G., Colella, S., Fayard, J.-M., Charles, H., … Calevro, F. (2011). Multimodal dynamic response of the *Buchnera aphidicola* pLeu plasmid to variations in leucine demand of its host, the pea aphid *Acyrthosiphon pisum*. *Molecular Microbiology*, 81(5), 1271–1285. https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2011.07760.x

Vogel, K. J., & Moran, N. A. (2013). Functional and evolutionary analysis of the genome of an obligate fungal symbiont. *Genome Biology and Evolution*, 5(5), 891–904. https://doi.org/10.1093/gbe/evt054

von Dohlen, C. D., & Moran, N. A. (2000). Molecular data support a rapid radiation of aphids in the Cretaceous and multiple origins of host alternation. *Biological Journal of the Linnean Society*, 71(4), 689–717. https://doi.org/10.1006/bijl.2000.0470

von Dohlen, C. D., Kohler, S., Alsop, S. T., & McManus, W. R. (2001). Mealybug β-proteobacterial endosymbionts contain γ-proteobacterial symbionts. *Nature*, 412(6845), 433–436. https://doi.org/10.1038/35086563

Vorburger, C., & Gouskov, A. (2011). Only helpful when required: A longevity cost of harbouring defensive symbionts. *Journal of Evolutionary Biology*, 24(7), 1611–1617. https://doi.org/10.1111/j.1420-9101.2011.02292.x

Wagner, S. M., Martinez, A. J., Ruan, Y.-M., Kim, K. L., Lenhart, P. A., Dehnel, A. C., … White, J. A. (2015). Facultative endosymbionts mediate dietary breadth in a polyphagous herbivore. *Functional Ecology*, 29(11), 1402–1410. https://doi.org/10.1111/1365-2435.12459

Wang, D., Griffitts, J., Starker, C., Fedorova, E., Limpens, E., Ivanov, S., … Long, S. (2010). A nodule-specific protein secretory pathway required for nitrogen-fixing symbiosis. *Science*, 327(5969), 1126–1129. https://doi.org/10.1126/science.1184096

Wei, Z., Guo, W., Jiang, S., Yan, D., Shi, Y., Wu, B., … Sun, Z. (2023). Transcriptional profiling reveals a critical role of *GmFT2a* in soybean staygreen syndrome caused by the pest *Riptortus pedestris*. *New Phytologist*, 237(5), 1876–1890. https://doi.org/10.1111/nph.18628

Wernegreen, J. J. (2002). Genome evolution in bacterial endosymbionts of insects. *Nature Reviews Genetics*, 3(11), 850–861. https://doi.org/10.1038/nrg931

Wernegreen, J. J. (2012). Endosymbiosis. *Current Biology*, 22(14), R555–R561. https://doi.org/10.1016/j.cub.2012.06.010

Wesseltoft, J. B., Danielsen, C. D., Andersen, A. M., de Jonge, N., Olsen, A., Rohde, P. D., & Kristensen, T. N. (2024). Feeding *Drosophila* gut microbiomes from young and old flies modifies the microbiome. *Scientific Reports*, 14(1), 7799. https://doi.org/10.1038/s41598-024-58500-1

West, S. A., Kiers, E. T., Simms, E. L., & Denison, R. F. (2002). Sanctions and mutualism stability: Why do rhizobia fix nitrogen? *Proceedings of the Royal Society of London. Series B: Biological Sciences*, 269(1492), 685–694. https://doi.org/10.1098/rspb.2001.1878

Whittle, M., Barreaux, A. M. G., Bonsall, M. B., Ponton, F., & English, S. (2021). Insect-host control of obligate, intracellular symbiont density. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, 288(1963), 20211993. https://doi.org/10.1098/rspb.2021.1993

Whittle, M., Bonsall, M. B., Barreaux, A. M., Ponton, F., & English, S. (2023). A theoretical model for host-controlled regulation of

Thèse accessible à l'adresse : https://theses.insa-lyon.fr/publication/2025ISAL0089/these.pdf © [H. Terrasson], [2025], INSA Lyon, tous droits réservés

symbiont density. *Journal of Evolutionary Biology*, 36(12), 1731–1744.

Wicker, C. (1983). Differential vitamin and choline requirements of symbiotic and aposymbiotic *S. oryzae* (Coleoptera: Curculionidae). *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Physiology*, 76(1), 177–182. https://doi.org/10.1016/0300-9629(83)90311-0

Wilkinson, T. L. (1998). The elimination of intracellular microorganisms from insects: An analysis of antibiotic-treatment in the pea aphid (*Acyrthosiphon pisum*). *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology*, 119(4), 871–881. https://doi.org/10.1016/S1095-6433(98)00013-0

Wilkinson, T. L., Koga, R., & Fukatsu, T. (2007). Role of host nutrition in symbiont regulation: Impact of dietary nitrogen on proliferation of obligate and facultative bacterial endosymbionts of the pea aphid *Acyrthosiphon pisum*. *Applied and Environmental Microbiology*, 73(4), 1362–1366. https://doi.org/10.1128/AEM.01211-06

Wilson, A. C. C., Ashton, P. D., Calevro, F., Charles, H., Colella, S., Febvay, G., … Douglas, A. E. (2010). Genomic insight into the amino acid relations of the pea aphid, *Acyrthosiphon pisum*, with its symbiotic bacterium *Buchnera aphidicola*. *Insect Molecular Biology*, 19(s2), 249–258. https://doi.org/10.1111/j.1365-2583.2009.00942.x

Wu, D., Daugherty, S. C., Van Aken, S. E., Pai, G. H., Watkins, K. L., Khouri, H., … Eisen, J. A. (2006). Metabolic complementarity and genomics of the dual bacterial symbiosis of sharpshooters. *PLoS Biology*, 4(6), e188. https://doi.org/10.1371/journal.pbio.0040188

Yang, J., Zhai, N., Chen, Y., Wang, L., Chen, R., & Pan, H. (2023). A signal peptide peptidase is required for ER-symbiosome proximal association and protein secretion. *Nature Communications*, *14*(1), 4355. https://doi.org/10.1038/s41467-023-40008-3

Yao, Z., Cai, Z., Ma, Q., Bai, S., Wang, Y., Zhang, P., … Zhang, H. (2022). Compartmentalized PGRP expression along the dipteran *Bactrocera dorsalis* gut forms a zone of protection for symbiotic bacteria. *Cell Reports*, *41*(3). https://doi.org/10.1016/j.celrep.2022.111523

Yi, H.-Y., Chowdhury, M., Huang, Y.-D., & Yu, X.-Q. (2014). Insect antimicrobial peptides and their applications. *Applied Microbiology and Biotechnology*, *98*(13), 5807–5822. https://doi.org/10.1007/s00253-014-5792-6

Yu, S., Luo, F., Xu, Y., Zhang, Y., & Jin, L. H. (2022). *Drosophila* innate immunity involves multiple signaling pathways and coordinated communication between different tissues. *Frontiers in Immunology*, *13*, 905370. https://doi.org/10.3389/fimmu.2022.905370

Yuki, M., Kuwahara, H., Shintani, M., Izawa, K., Sato, T., Starns, D., … Ohkuma, M. (2015). Dominant ectosymbiotic bacteria of cellulolytic protists in the termite gut also have the potential to digest lignocellulose. *Environmental Microbiology*, *17*(12), 4942–4953. https://doi.org/10.1111/1462-2920.12945

Zaidman-Rémy, A., Hervé, M., Poidevin, M., Pili-Floury, S., Kim, M.-S., Blanot, D., … Lemaitre, B. (2006). The *Drosophila* amidase PGRP-LB modulates the immune response to bacterial infection. *Immunity*, *24*(4), 463–473. https://doi.org/10.1016/j.immuni.2006.02.012

Zanuttini, B., Henry, J., Couronne, C., Ouali, A., Robert, V., & Zatylny-Gaudin, C. (2023). PepTraq: A toolbox for in silico data mining and fast sequence filtering. *Amino Acids*, *55*(5), 709–712. https://doi.org/10.1007/s00726-023-03251-y

Zasloff, M. (2002). Antimicrobial peptides of multicellular organisms. *Nature*, *415*(6870), 389–395. https://doi.org/10.1038/415389a

Zchori-Fein, E., Lahav, T., & Freilich, S. (2014). Variations in the identity and complexity of endosymbiont combinations in whitefly hosts. *Frontiers in Microbiology*, *5*, 310. https://doi.org/10.3389/fmicb.2014.00310

Zhang, W., Tettamanti, G., Bassal, T., Heryanto, C., Eleftherianos, I., & Mohamed, A. (2021). Regulators and signalling in insect antimicrobial innate immunity: Functional molecules and cellular pathways. *Cellular Signalling*, *83*, 110003. https://doi.org/10.1016/j.cellsig.2021.110003

Zhao, Y.-J., Li, Y.-M., Yang, T., & Lu, Z. (2024). The Janus kinase/signal transducers and activators of transcription (JAK/STAT) pathway contributes to the defense against bacterial infection in the pea aphid. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, *202*, 105915. https://doi.org/10.1016/j.pestbp.2024.105915

Zheng, H., Dietrich, C., Thompson, C. L., Meuser, K., & Brune, A. (2015). Population structure of *Endomicrobia* in single host cells of termite gut flagellates (*Trichonympha* spp.). *Microbes and Environments*, *30*(1), 92–98. https://doi.org/10.1264/jsme2.ME14169

Zheng, H., Powell, J. E., Steele, M. I., Dietrich, C., & Moran, N. A. (2017). Honeybee gut microbiota promotes host weight gain *via* bacterial metabolism and hormonal signaling. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *114*(18), 4775–4780. https://doi.org/10.1073/pnas.1701819114

Zhou, L., Meng, G., Zhu, L., Ma, L., & Chen, K. (2024). Insect antimicrobial peptides as guardians of immunity and beyond: A review. *International Journal of Molecular Sciences*, *25*(7), 3835. https://doi.org/10.3390/ijms25073835

Zong, X., Fu, J., Xu, B., Wang, Y., & Jin, M. (2020). Interplay between gut microbiota and antimicrobial peptides. *Animal Nutrition*,

Thèse accessible à l'adresse : https://theses.insa-lyon.fr/publication/2025ISAL0089/these.pdf © [H. Terrasson], [2025], INSA Lyon, tous droits réservés

6(4), 389–396. https://doi.org/10.1016/j.aninu.2020.09.002

Zytynska, S. E., & Weisser, W. W. (2016). The natural occurrence of secondary bacterial symbionts in aphids. *Ecological Entomology*, *41*(1), 13–26. https://doi.org/10.1111/een.12281

Zytynska, S. E., Tighiouart, K., & Frago, E. (2021). Benefits and costs of hosting facultative symbionts in plant-sucking insects: A meta-analysis. *Molecular Ecology*, *30*(11), 2483–2494. https://doi.org/10.1111/mec.15897

Thèse accessible à l'adresse : https://theses.insa-lyon.fr/publication/2025ISAL0089/these.pdf © [H. Terrasson], [2025], INSA Lyon, tous droits réservés

Hugo Terrasson

Curriculum vitae – Mis à jour en Novembre 2025

Informations personnelles

Né le 10 Octobre 1997 (28 ans) à Poitiers, France.

Contact

UMR 0203 INRAE/INSA Lyon - BF2i
Bâtiment Pasteur - Biosciences Département
INSA Lyon - 11, avenue Capelle
69621 Villeurbanne Cedex – France

Tel. professionnel : 04 72 43 83 56
Tel. personnel : 06 32 72 76 93
Mail professionnel : hugo.terrasson@insa-lyon.fr
Mail personnel : hugoo-ohugo@hotmail.fr

Situation professionnelle actuelle

Depuis Novembre 2025 — **Post-doctorat**
Employeur : INSA Lyon
Superviseur : Pr. Pedro Da Silva
Lieu : UMR 0203 INRAE/INSA Lyon BF2i, Villeurbanne
Sujet : *Production optimisée de bioinsecticides peptiques recombinants (ProBioPrep)*
Description : « ProBioPep » est un projet de pré-maturation co-financé par l'INSA Lyon et PULSALYS, visant à développer une méthode de production optimisée de bioinsecticides peptidiques recombinants, en évaluant différents systèmes d'expression (*Pichia pastoris*, *Escherichia coli*) pour proposer une alternative durable et économiquement viable aux pesticides de synthèse

Parcours académique

2021 - 2025 — **Doctorat**
INSA Lyon – ED Evolution, Ecosystèmes, Microbiologie et Modélisation (E2M2 - UCBL)
Directeurs de thèse : Pr. Pedro Da Silva & Dr. Federica Calevro
Lieu : UMR 0203 INRAE/INSA Lyon BF2i, Villeurbanne
Sujet : *Rôle des peptides « Bacteriocyte-specific Cysteine-rich » dans le contrôle de la symbiose chez le puceron du pois*

2019 - 2021 — **Master Biodiversité, Écologie, Évolution**
Université de Poitiers, Poitiers, France

2015 - 2019 — **Licence Ecologie et Biologie des Organismes**
Université de Poitiers, Poitiers, France

2015 — **Baccalauréat Scientifique, spécialité Biologie**
Lycée Victor-Hugo, Poitiers, France

Stages

Janvier - Juillet 2021 (7 mois) — **Stage de recherche de Master 2**
Encadrante : Pr. Christine Braquart-Varnier
Sujet : *Caractérisation de l'ultrastructure des organes hématopoïétiques d'Armadillidium vulgare par microscopie 3D.*

Thèse accessible à l'adresse : https://theses.insa-lyon.fr/publication/2025ISAL0089/these.pdf © [H. Terrasson], [2025], INSA Lyon, tous droits réservés

Lieu : UMR CNRS 7267 – Laboratoire Écologie, Biologie et Interactions (équipe Écologie, Évolution, Symbiose), Poitiers, France

Mai – Août 2019 (4 mois) **Stage de fin de Licence**
Encadrant : Dr. Eric Maurer
Sujet : *Comparaison des anticorps produits dans la rate, la moelle osseuse et les ganglions lymphatiques après immunisation chez la souris.*
Lieu : Entreprise AGRO-BIO – Département R&D, La Ferté-Saint-Aubin, France

Formations

2025 **Illustration scientifique avec le logiciel IMAGE J – 7h**
Université Claude Bernard Lyon 1, Villeurbanne

2025 **MOOC Introduction à la statistique avec R – 25h**
Université Claude Bernard Lyon 1, Villeurbanne

2024 **"Write and publish your scientific paper" – 20 h**
Université Claude Bernard Lyon 1, Villeurbanne

2022 **MOOC Éthique de la recherche et intégrité scientifique – 30 h**
Université Claude Bernard Lyon 1, Villeurbanne

2022 **Microscopie confocale – 10 h**
Centre technologique des microstructures (Ctμ), Villeurbanne

2021 **Microscopie électronique à balayage en mode "Serial Block-Face" (préparation des échantillons et logiciel "Maps") – 1 semaine**
Plateforme d'imagerie de l'Université de Poitiers (ImageUP), Poitiers

2021 **Logiciel AMIRA (analyse d'images 3D) – 1 semaine**
Plateforme d'imagerie de l'Université de Poitiers (ImageUP), Poitiers

Enseignements

Enseignements en 4e année d'ingénieur – Département Biosciences INSA Lyon

2021-2022 **Parcours "Biotechnologies et imagerie cellulaire" (33 étudiants ; 2 groupes)** – 48h TP/an

- Module « Culture cellulaire et imagerie » (32h)
  - ✓ Objectif pour les étudiants : introduction à la culture cellulaire ; maintien d'une lignée cellulaire (observation ; comptage ; dilution ; passages) ; test de cytotoxicité (H_2O_2) et test de viabilité (MTT) ; observation des signes de l'apoptose en microscopie à fluorescence
  - ✓ Préparation des cellules (macrophages murins)
  - ✓ Présentation du TP, du matériel et des bonnes pratiques en culture cellulaire
  - ✓ Garanti de la bonne tenue du TP (conseils aux étudiants ; horaires)
  - ✓ Utilisation du microscope à fluorescence et discussion des résultats avec les étudiants (marquage DAPI/Syto9/phalloïdine)
  - ✓ Préparation et correction des examens (QCM + compte-rendu de TP)
- Module « Immunologie » (16h)
  - ✓ Objectif pour les étudiants : introduction aux anticorps en tant qu'outils biotechnologique ; utilisation d'anticorps primaires et secondaires divers ; test d'immunodiffusion radiale (Mancini) pour identifier la nature des antigènes dans des solutions
  - ✓ Commande et préparation des solutions

Thèse accessible à l'adresse : https://theses.insa-lyon.fr/publication/2025ISAL0089/these.pdf © [H. Terrasson], [2025], INSA Lyon, tous droits réservés

- ✓ Cours sur les anticorps (origine immunologique ; outils biotechnologiques ; principes généraux)
- ✓ Garanti de la bonne tenue du TP (conseils aux étudiants ; horaires)
- ✓ Préparation et correction des examens (QCM + compte-rendu de TP)

2022-2023 **Parcours "Biotechnologies et imagerie cellulaire" (32 étudiants ; 2 groupes)** – 64h TP/an

- Module « Culture cellulaire et imagerie » (32h)
  - ✓ Mêmes missions que l'année précédente
  - ✓ Préparation et correction des examens (QCM + Poster)
- Module « Biologie moléculaire et imagerie » (32h)
  - ✓ Objectif pour les étudiants : mise en pratique des connaissances en biologie moléculaire à travers un mini projet de recherche ; suivi des traits d'histoire de vie de charançon ; qPCR pour comptage de bactéries symbiotiques ; FISH sur coupes pour localiser les bactéries symbiotiques
  - ✓ Commande et préparation du matériel
  - ✓ Présentation du TP, du matériel et des bonnes pratiques en biologie moléculaire
  - ✓ Utilisation du microscope à fluorescence et discussion des résultats avec les étudiants (marquage FISH, DAPI, phalloïdine)
  - ✓ Préparation et correction des examens (Compte-rendu de TP sous forme d'article scientifique)

Prix & Récompenses

2022 **Bourse de mobilité** accordée par le réseau BAPOA pour participer au 12e colloque annuel du réseau *Biologie Adaptative des Pucerons et Organismes Associés* (Université de Nice, France)

2022 **Prix de la meilleure présentation orale** au 9e colloque du réseau GDR MuFoPAM, Amboise, France

2024 **Bourse de mobilité** accordée par le réseau PISI-net (*Plant-Insect-Symbiont Interactions Research Network*) pour participer au congrès *XXVII International Congress of Entomology*, Kyoto, Japon

2024 **Médaille de la Distinction Scientifique de l'INSA Lyon** pour l'excellence des travaux de recherche, Lyon, France

Thèse accessible à l'adresse : https://theses.insa-lyon.fr/publication/2025ISAL0089/these.pdf © [H. Terrasson], [2025], INSA Lyon, tous droits réservés

Publications scientifiques

1. Loth, K., Parisot, N., Paquet, F., **Terrasson, H.**, Sivignon, C., Rahioui, I., Ribeiro Lopes M., Gaget K., Duport G., Agnès D., Aucagne V., Heddi A., Calevro F., Da Silva P. (2022). Aphid BCR4 Structure and Activity Uncover a New Defensin Peptide Superfamily. *International Journal of Molecular Sciences*, 23(20), 12480. https://doi.org/10.3390/ijms232012480

2. **Terrasson, H.**, Gaget, K., Lapetoule, G., Rahioui, I., Renoz, F., Benhamou, S., Jouve C., Sivignon C., Duport G., Aucagne V., Simon JC., Ribeiro Lopes M., Calevro F., Da Silva, P. (2025). Strong impact of orally administered BCR4 defensin on aphid survival, embryo development, and symbiotic cells in three Acyrthosiphon pisum parthenogenetic lines. *Journal of Pest Science*, 98(3), 1599–1612. https://doi.org/10.1007/s10340-025-01923-0

3. Huygens C., Baz ES., Donckers J., **Terrasson H.**, Gaget K., Lapetoule L., Vanden Broeck J., Ribeiro Lopes M., Callaerts P. (2025) Functional characterization and expression analysis of pyrokinin/PBAN peptides and their receptors in the pea aphid *Acyrthosiphon pisum*. *Under revision for Insect Science*

Communications scientifiques

Présentations orales

1. **Terrasson H**., Loth K., Parisot N., Paquet F., Rahioui I., Gaget K., Duport G., Aucagne V., Delmas A., Heddi A., Ribeiro Lopes M., Calevro F., Da Silva P. (2022) Bacteriocyte-specific Cysteine Rich" peptides (BCRs): a role in controlling symbiosis? Focus on BCR4 in pea aphids. *12th BAPOA network meeting*, May 2022, Nice, France

2. **Terrasson H**., Loth K., Parisot N., Paquet F., Rahioui I., Gaget K., Duport G., Aucagne V., Delmas A., Heddi A., Ribeiro Lopes M., Calevro F., Da Silva P. (2022) Bacteriocyte-specific Cysteine-Rich peptides: a new family of defensins and regulators of aphids symbiosis? *9th GDR MuFoPAM network meeting*. October 2022, Amboise, France.

3. **Terrasson H**., Parisot N., Loth K., Rahioui I., Gaget K., Duport MG., Aucagne V., Agnès D., Abdelaziz Heddi A. Ribeiro Lopes M., Calevro F., Da Silva P. (2023) Bacteriocyte-specific Cysteine-Rich (BCR) peptides form a new aphid-specific defensin-like family and are promising regulators of aphid symbiosis. *GDR REID network meeting*. May 2023, Poitiers, France

4. **Terrasson H**., Gaget K., Balmand S., Rahioui I., Ribeiro Lopes M., Callaerts P., Da Silva P., Calevro F. (2023) Immunolocalization of "Bacteriocyte-specific Cysteine-Rich" (BCR) peptides, potential regulators of aphid symbiosis. *13rd BAPOA network meeting*, November 2023, Villeurbanne, France.

5. **Terrasson H.**, Gaget K., Balmand S., Rahioui I., Callaerts P., Ribeiro Lopes M., Calevro F., Da Silva P. (2024) Subcellular localization of BCR4, an aphid-specific defensin peptide, in the bacteriocytes of Acyrthosiphon pisum. *2nd MuFoPAM network meeting* April 2024, Virtual, France.

6. Renoz F., Gaget K., Charles H., Ribeiro Lopes M., Parisot N., Benhamou S., Duport MG., Baa-Puyoulet., **Terrasson H**., Callaerts P., Hans T., Calevro F. (2024) Two-way cooperation in a single symbiotic organ: the developmental chronicle of a multi-partner insect endosymbiosis. *3rd Joint Congress on Evolutionary Biology*, July 2024, Montreal, Canada.

7. Renoz F., Gaget K., Charles H., Parisot N., Baa-Puyoulet P., Ribeiro Lopes M., Benhamou S., Duport MG., **Terrasson H**., Callaerts P., Hans T., Calevro F. (2024) Evolution towards a two-way cooperation in a single symbiotic organ: the developmental chronicle of a multi-partner insect endosymbiosis. *International congress of Ecology and Evolution (SFE2)*, October 2024, Lyon, France.

Thèse accessible à l'adresse : https://theses.insa-lyon.fr/publication/2025ISAL0089/these.pdf © [H. Terrasson], [2025], INSA Lyon, tous droits réservés

8. **Terrasson H**., Gaget K., Lapetoule G., Rahioui I., Renoz F., Jouve C., Duport MG., Simon JC., Ribeiro Lopes M., Calevro F., Da Silva P. (BCR4, a defensin with a strong impact on aphid survival, embryo development and symbiotic cells of three *Acyrthosiphon pisum* lines. *14th BAPOA network meeting*, November 2024, Montpellier, France

Présentations affichées

1. **Terrasson H**., Loth K., Parisot N., Paquet F., Rahioui I., Gaget K., Duport G., Vincent-Monégat C., Aucagne V., Delmas A., Heddi A., Ribeiro Lopes M., Calevro F., Da Silva P. (2023) The Bacteriocyte-specific Cysteine-Rich (BCR) proteins: a role in the control of aphid symbiosis*? Congrés INSA santé globale et bioingénierie*, April 2023, Lyon, France

2. **Terrasson H**., Loth K., Parisot N., Paquet F., Rahioui I., Gaget K., Duport G., Vincent-Monégat C., Aucagne V., Delmas A., Heddi A., Ribeiro Lopes M., Calevro F., Da Silva P. (2022) Bacteriocyte-specific Cysteine-Rich (BCR) peptides, a new aphid's defensin-like family, are promising regulators of aphid symbiosis. *10th congress of the International Society of Symbiosis*, July 2022, Lyon, France

3. **Terrasson H**., Loth K., Parisot N., Paquet F., Rahioui., Gaget K., Balmand S., Vincent-Monégat C., Aucagne V., Agnès D., Abdelaziz Heddi A., Ribeiro Lopes M., Calevro F., Da Silva P. (2024) The aphid BCR4 structure and activity uncover a new defensin peptide superfamily. *XXVII International Congress of Entomology*, August 2024, Kyoto, Japan.

Thèse accessible à l'adresse : https://theses.insa-lyon.fr/publication/2025ISAL0089/these.pdf © [H. Terrasson], [2025], INSA Lyon, tous droits réservés

1) Matériel supplémentaire du Chapitre 1

Thèse accessible à l'adresse : https://theses.insa-lyon.fr/publication/2025ISAL0089/these.pdf © [H. Terrasson], [2025], INSA Lyon, tous droits réservés

SUPPLEMENTARY INFORMATION

Aphid BCR4 Structure and Activity Uncover a New Defensin Peptide Superfamily

Karine Loth [1,2,†], Nicolas Parisot [3,†], Françoise Paquet [1], Hugo Terrasson [3], Catherine Sivignon [4], Isabelle Rahioui [4], Mélanie Ribeiro Lopes [3], Karen Gaget [4], Gabrielle Duport [4], Agnès F. Delmas [1], Vincent Aucagne [1], Abdelaziz Heddi [3], Federica Calevro [4] and Pedro da Silva [3,*]

[1] Centre de Biophysique Moléculaire, CNRS UPR 4301, 45071 Orléans, France
[2] UFR Sciences et Techniques, Université d'Orléans, 45071 Orléans, France
[3] Univ Lyon, INSA Lyon, INRAE, BF2I, UMR 203, 69621 Villeurbanne, France
[4] Univ Lyon, INRAE, INSA Lyon, BF2I, UMR 203, 69621 Villeurbanne, France
* Correspondence: pedro.da-silva@insa-lyon.fr
† These authors contributed equally to this work.

This PDF file includes:

Supplementary methods for BCR4 chemical synthesis (including table S1 and Figures S1 to S10)

Table S2

Thèse accessible à l'adresse : https://theses.insa-lyon.fr/publication/2025ISAL0089/these.pdf © [H. Terrasson], [2025], INSA Lyon, tous droits réservés

BCR4 chemical Synthesis

1. General information

All reagents and solvents were used without further purification. Protected amino acids, Fmoc-Rink amide linker, Fmoc-Tyr(*t*Bu)-Thr($\Psi^{(Me,Me)Pro}$)-OH and HCTU were purchased from Merck Biosciences (Nottingham, UK). Tentagel R NH_2 and Wang-type Fmoc-Asp(O*t*Bu) TentaGel R PHB resins were purchased from Rapp polymers (Tuebingen, Germany). Peptide synthesis grade DMF was purchased from VWR (Fontenay-sous-Bois, France). Ultrapure water was obtained using a Milli-Q water system from Millipore (Molsheim, France). All other chemicals were from Sigma Aldrich (St-Quentin-Fallavier, France) and solvents from SDS-Carlo Erba (Val de Reuil, France).

High resolution ESI-MS analyses were performed on a maXis ultra-high-resolution Q-TOF mass spectrometer (Bruker Daltonics, Bremen, Germany), using the positive mode. The multiply-charged envelope was deconvoluted using the Charge Deconvolution algorithm in Bruker Data Analysis 4.1 software to obtain the monoisotopic $[M+H]^+$ molecular ion value. HPLC analyses were carried out on a LaChrom Elite system consisting of an L-2130 pump, an L-2455 diode array detector and an L-2200 autosampler, and equipped with a Jupiter C4 column (300 Å, 5 µm, 250 × 4.6 mm, 1 mL/min flow rate). Semi-preparative HPLC purifications were carried out on a Chromaster 600 system consisting of a 5160 pump, a 5430 diode array detector and a 5260 autosampler, equipped with either a Jupiter C4 (300 Å, 5 µm, 250 × 10 mm, 3 mL/min flow rate) or a Nucleosil C18 (300 Å, 5 µm, 250 × 10 mm, 3 mL/min flow rate) column. Solvents A and B are 0.1% TFA in H_2O and 0.1% TFA in MeCN, respectively. Chromatography was conducted at room temperature unless otherwise mentioned. LC/HRMS analyses were carried out on an Ultimate 3000 RSLC HPLC system (Dionex, Germering, Germany), coupled with the maXis mass spectrometer and fitted with a Aeris WidePore XB-

Thèse accessible à l'adresse : https://theses.insa-lyon.fr/publication/2025ISAL0089/these.pdf © [H. Terrasson], [2025], INSA Lyon, tous droits réservés

C18 (200 Å, 3.6 µm, 2.1 × 150 mm, 0.5 mL/min flow rate, 40°C) column. Solvents A and B were 0.1% formic acid in H_2O and 0.08% formic acid in MeCN, respectively. Gradient: 3% B for 0.6 min, then 3 to 50% B over 10.8 min.

Unless specified otherwise, quantities of purified peptides were determined by weight, based on a molecular mass taking into account trifluoroacetate counter-ions (one per Arg, His, Lys and N-terminal amine of the peptide sequence) but not water content.

Deoxygenation of solutions used for native chemical ligation and oxidative folding was performed through four consecutive vacuum (~5 mbar)/argon cycles.

2. General procedures for solid phase peptide synthesis

Fmoc-based solid phase peptide syntheses (SPPS) were carried out on a Prelude synthesizer from Protein Technologies (Tucson, Arizona USA). Standard side-chain protecting groups were used: Arg(Pbf), Asn(Trt), Asp(O*t*Bu), Cys(Trt), Glu(O*t*Bu), Gln(Trt), His(Trt), Lys(Boc), Ser(*t*Bu), Thr(*t*Bu), Trp(Boc) and Tyr(*t*Bu), as well as Cys(S*t*Bu) for the thioesterification device.

Syntheses were performed at a 25 µmol scale. Protected amino acids (0.25 mmol, 10 equiv.) were coupled using HCTU (98 mg, 0.238 mmol, 9.5 equiv.) and iPr$_2$NEt (87 µL, 0.5 mmol, 20 equiv.) in NMP (3 mL) for 30 min. Capping of potential unreacted amine groups was achieved by treatment with acetic anhydride (143 µL, 1.51 mmol, 60 equiv.), iPr$_2$NEt (68 µL, 0.39 mmol, 15.5 equiv.) and HOBt (6 mg, 0.044 mmol, 1.8 equiv.) in NMP (3 mL) for 7 min. Fmoc group was removed by three successive treatments with 20% piperidine in NMP (3 mL) for 3 min. Deprotection and cleavage from the resin was performed through a treatment with TFA/H_2O/iPr$_3$SiH/phenol (88:5:2:5) for 2 h, then precipitated by dilution into an ice-cold 1:1 diethyl ether/petroleum ether mixture, recovered by centrifugation, further washed three times with diethyl ether and dried under reduced pressure.

Thèse accessible à l'adresse : https://theses.insa-lyon.fr/publication/2025ISAL0089/these.pdf © [H. Terrasson], [2025], INSA Lyon, tous droits réservés

3. Single fragment solid phase synthesis of the reduced form of BCR4

Sequence:

H-^{1}DFDPTEFKGPFPTIEICSKYCAVVCNYTSRPCYCVEAAKERDQWFPYCY^{50}D-OH

Synthesis of the reduced form of BCR4 was first attempted through a single fragment Fmoc SPPS, starting from Fmoc-Asp(O*t*Bu) TentaGel R PHB resin (132 mg, 0.19 mmol/g, 25 µmol). Tyr27 and Thr28 were introduced as a pseudoproline dipeptide (Fmoc-Tyr(tBu)-Thr($\Psi^{(Me,Me)Pro}$)-OH), and a double coupling procedure (2 x 30min) was used for residues Asn26 to Asp1.

Even using this optimized protocol, the target peptide was a minor component of the crude mixture, and we could not separate it from truncated acetylated peptides contaminants using standard semi-preparative HPLC.

ESI-HRMS (*m/z*): $[M+H]^+$ calcd. for $C_{266}H_{379}N_{62}O_{79}S_6$: 5897.5869, found: 5897.5911.

HPLC analysis: t_R = 29.6 min (gradient: 5-50% B/A over 30 min).

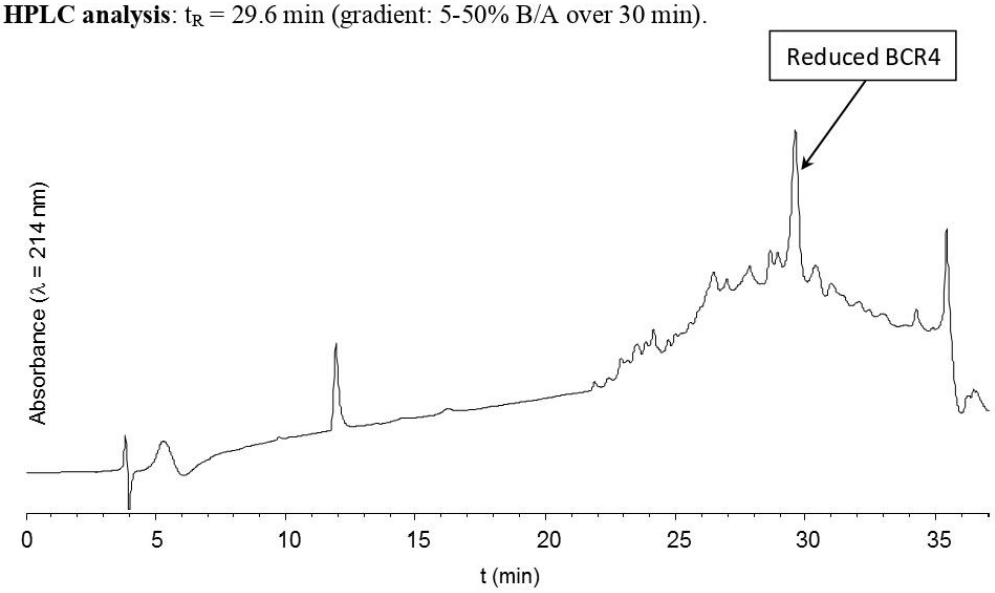


Figure S1: HPLC trace of crude reduced BCR4 obtained from a single fragment synthesis. Gradient: 5-50% B/A over 30 min.

Thèse accessible à l'adresse : https://theses.insa-lyon.fr/publication/2025ISAL0089/these.pdf © [H. Terrasson], [2025], INSA Lyon, tous droits réservés

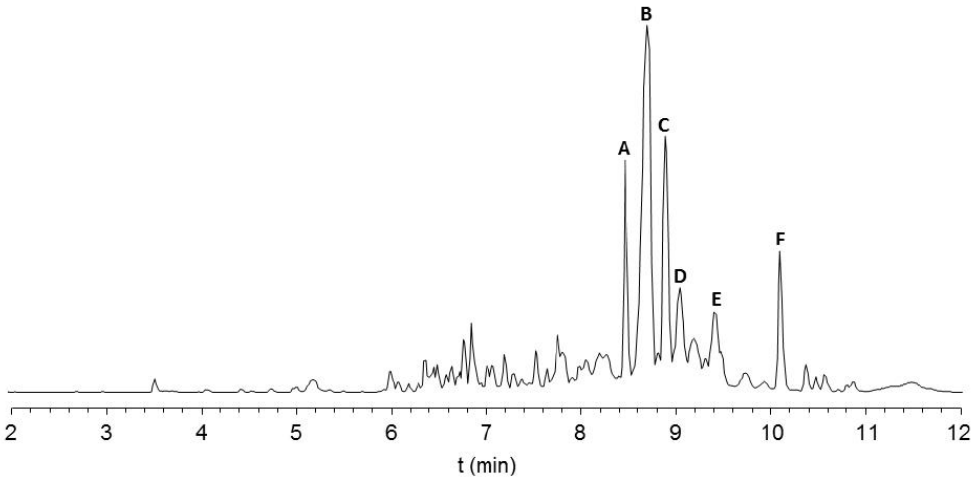


Figure S2: LC/MS analysis of crude reduced BCR4 obtained from a single fragment synthesis (base peak ion chromatogram).

Table S1: Attribution of the main peaks observed during LC/MS analysis of crude reduced BCR4 obtained from a single fragment synthesis.

Peak (t_R (min))	$[M+H]^+$ calcd.	$[M+H]^+$ found	Attributed to
A (8.48)	4561.9734	4561.9759	Ac-[13-50]
B (8.71)	4659.0262	4659.0286	Ac-[12-50]
C (8.90)	5897.5869	5897.5911	[1-50]: reduced form of BCR4
D (9.06)	4715.0888	4713.0826	Ac-[13-50] *t*Bu adduct
E (9.17)	5953.6495	5953.6548	[1-50] *t*Bu adduct
F (10.11)	4742.0309	4742.0321	Fmoc-[13-50]

4. Native chemical ligation-based synthesis of the reduced form of BCR4

Considering the difficulties observed during the single fragment SPPS, synthesis of the reduced form of BCR4 was achieved through a two-fragment native chemical ligation (NCL) strategy, based on the reaction of a [1-20] *N*-2-hydroxy-5-nitrobenzylcysteine (*N*-Hnb-Cys) crypto-thioester[1] with a [21-50] cysteinyl peptide (supplementary figure S3).

[1] (a) V. P. Terrier, H. Adihou, M. Arnould, A. F. Delmas, V. Aucagne, *Chem. Sci.*, **2016**, *7*, 339–345 (b) D. Lelièvre, V. P. Terrier, A. F. Delmas, V. Aucagne, *Org. Lett.*, **2016**, *18*, 920–923 (c) V. P. Terrier, A. F. Delmas, V. Aucagne, *Org. Biomol. Chem.*, **2017**, *15*, 316–319 (d) G. Martinez, J.-P. Hograindleur, S. Voisin, R. Abi Nahed, T. M. Abd El Aziz, J. Escoffier, J. Bessonnat, C.-M. Fovet, M. De Waard, S. Hennebicq, V. Aucagne, P. F. Ray, E. Schmitt, P. Bulet, C. Arnoult, *Mol. Hum. Rep.*, **2017**, *23*, 116–131.

Thèse accessible à l'adresse : https://theses.insa-lyon.fr/publication/2025ISAL0089/these.pdf © [H. Terrasson], [2025], INSA Lyon, tous droits réservés

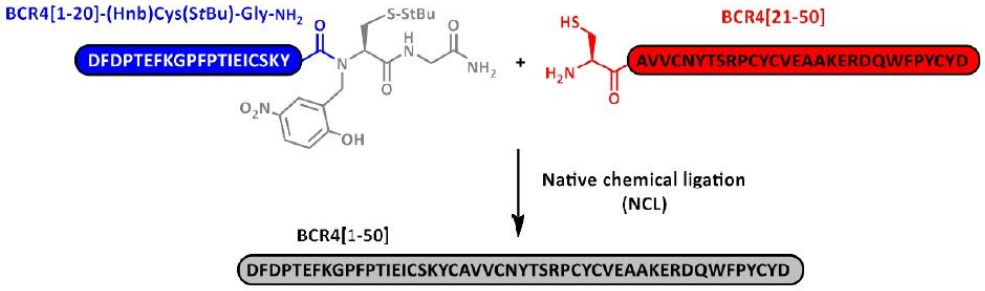


Figure S3: NCL-based synthesis of the reduced form of BCR4.

4.1- Synthesis of BCR4[1-20] crypto thioester

Sequence: H-^{1}DFDPTEFKGPFPTIEICSK^{20}Y-(Hnb)C(StBu)G-NH_2

Rink linker, Fmoc-Gly-OH and Fmoc-Cys(S*t*Bu)-OH were successively coupled by automated SPPS on a Tentagel R NH_2 resin (120 mg, 0.21 mmol/g, 25 µmol). Resulting peptidyl resin was washed with a 1:1 DMF/MeOH mixture, then swollen in 9:9:2 DMF/MeOH/AcOH for 5 min. The reactor was drained off and the resin was washed with 1:1 DMF/MeOH. 2-Hydroxy-5-nitrobenzaldehyde (HNBA) in 1:1 DMF/MeOH (125 mM, 10 equiv., 2 mL) was then added and the reactor was left for 1 h under stirring through nitrogen bubbling. The reactor was drained and the resin was washed with 1:1 DMF/MeOH. Without delay, a fresh solution of sodium cyanoborohydride in 9:9:2 DMF/MeOH/AcOH (250 mM, 20 equiv. 2 mL) were added and the reactor was left for 1 h under stirring by nitrogen bubbling. The reactor was drained off and the resin was extensively washed with 1:1 DMF/MeOH, NMP, 20% piperidine in NMP, NMP, dichloromethane then NMP. Tyr20 was introduced through a 3 x 2 h coupling protocol, then the elongation from residues 19 to 1 was pursued using standard conditions, using a double coupling procedure for residues Pro12 and Phe11.

Crude peptide was purified by semi-preparative RP-HPLC to yield pure crypto thioester (15 mg, 4.9 µmol, 20%).

Thèse accessible à l'adresse : https://theses.insa-lyon.fr/publication/2025ISAL0089/these.pdf © [H. Terrasson], [2025], INSA Lyon, tous droits réservés

We found that the Asp3-Pro4 peptide bond was particularly sensitive to acid hydrolysis:[2] The crude or purified peptide should not be kept in HPLC solvents (0.1% TFA) for a prolonged time (>10 h) nor be heated above room temperature under these conditions, and the purified fractions should be lyophilized immediately after purification. Peptide re-dissolved in pure water was however stable for a few months at -20°C.

ESI-HRMS (*m/z*): $[M+H]^+$ calcd. for $C_{125}H_{179}N_{26}O_{37}S_3$: 2732.2087, found: 2732.2119.

HPLC analysis: t_R = 19.6 min (gradient: 20-55% B/A over 21 min).

HPLC purification: t_R = 17.4 min (Jupiter C4, gradient: 30-55% B/A over 19 min).

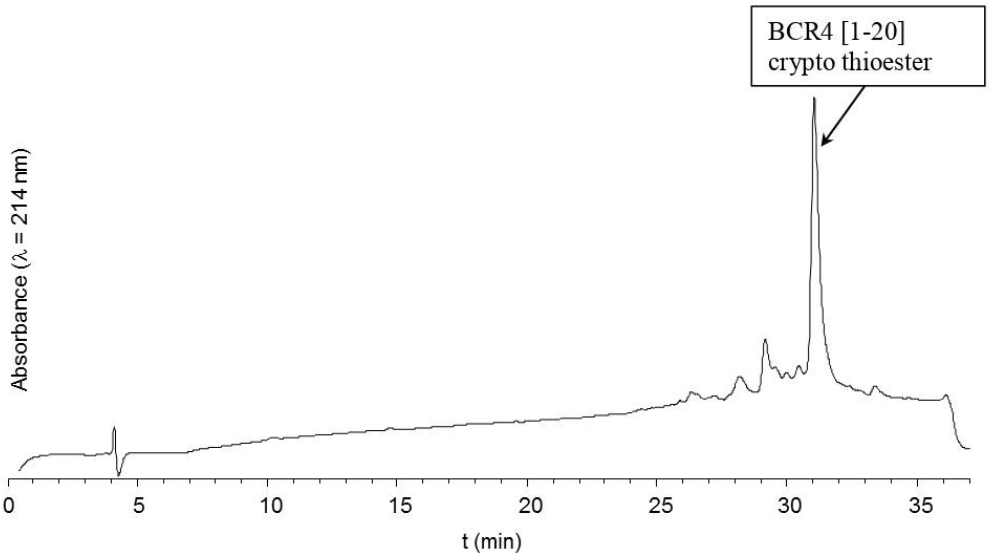


Figure S4: HPLC trace of crude BCR4[1-20] crypto thioester. Gradient: 5-50% B/A over 30 min.

[2] (a) D. Piszkiewicz, M. Landon, E. L. Smith, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **1970**, *40*, 1173–1178 (b) I. Ségalas, R. Thai, R. Ménez, C. Vita, FEBS Lett., **1995**, *371*, 171–175.

Thèse accessible à l'adresse : https://theses.insa-lyon.fr/publication/2025ISAL0089/these.pdf © [H. Terrasson], [2025], INSA Lyon, tous droits réservés

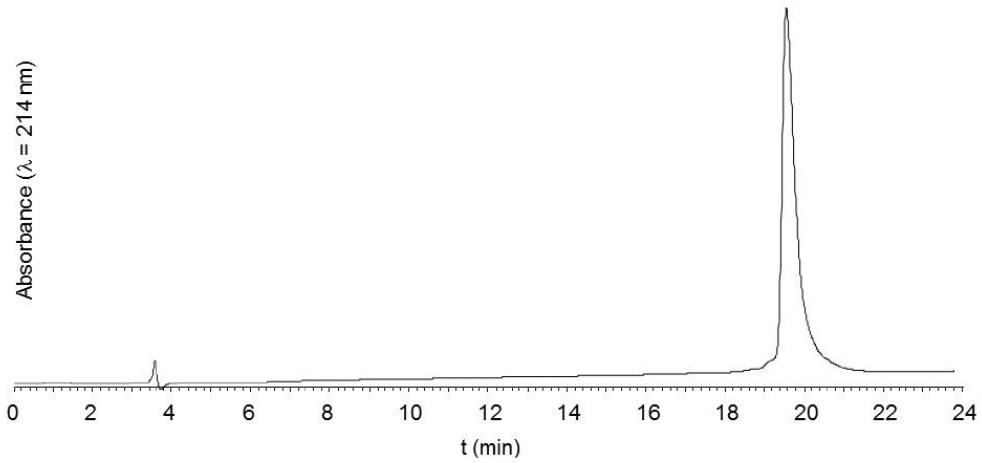


Figure S5: HPLC trace of purified BCR4[1-20] crypto thioester. Gradient: 20-55% B/A over 21 min.

4.2- Synthesis of BCR4[21-50] cysteinyl peptide

Sequence: H-^{21}CAVVCNYTSRPCYCVEAAKERDQWFPYCY^{50}D-OH

BCR4 [21-50] cysteinyl peptide was synthesized through standard Fmoc SPPS starting from Fmoc-Asp(O*t*Bu) TentaGel R PHB resin (132 mg, 0.19 mmol/g, 25 µmol), using a double coupling procedure for residues Ala39 to Val23.

Crude peptide was purified by semi-preparative RP-HPLC to yield pure cysteinyl peptide (16 mg, 4.0 µmol, 16%).

ESI-HRMS (*m/z*): $[M+H]^+$ calcd. for $C_{157}H_{225}N_{40}O_{47}S_5$: 3582.5049, found: 3582.5067.

HPLC analysis: t_R = 13.9 min (gradient: 20-55% B/A over 21 min).

HPLC purification: t_R = 14.2 min (Nucleosil C18, gradient: 25-30% B/A over 15 min, 50°C).

Thèse accessible à l'adresse : https://theses.insa-lyon.fr/publication/2025ISAL0089/these.pdf © [H. Terrasson], [2025], INSA Lyon, tous droits réservés

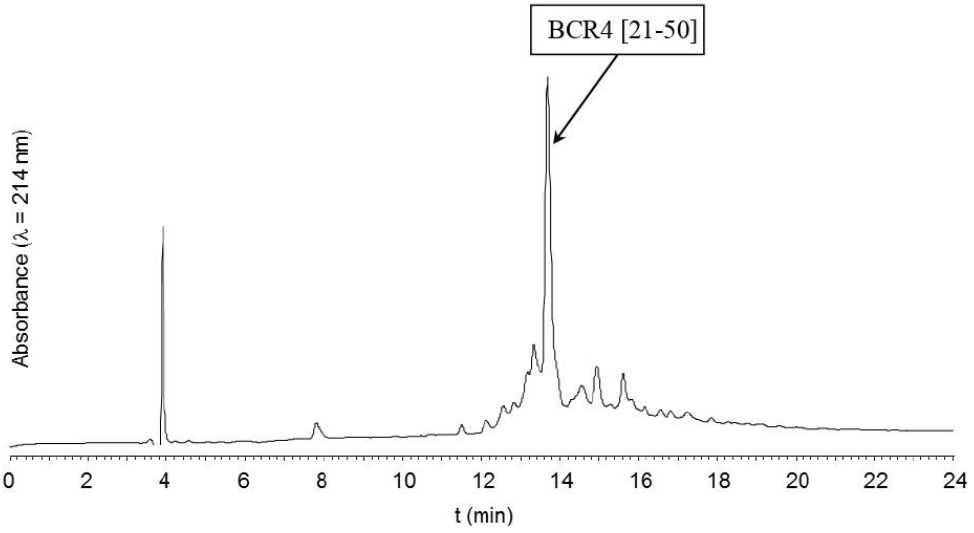


Figure S6: HPLC trace of crude BCR4[21-50]. Gradient: 20-55% B/A over 21 min.

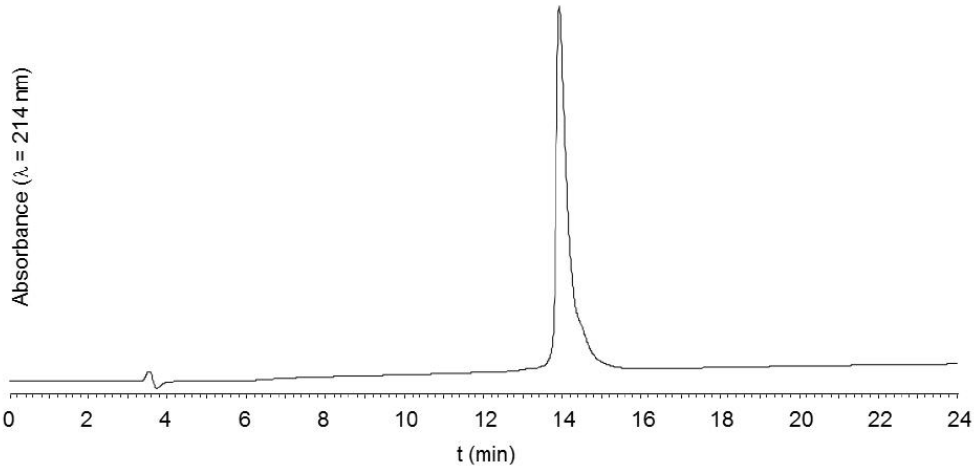


Figure S7: HPLC trace of purified BCR4[21-50]. Gradient: 20-55% B/A over 21 min.

4.3- Native chemical ligation

Under an argon atmosphere, 765 µl of a deoxygenated 0.2 M sodium phosphate buffer pH = 6.5 containing 200 mM 4-mercaptophenylacetic acid (MPAA), 50 mM *tris*-carboxyethylphosphine (TCEP) and 6 M guanidine hydrochloride (Gu.HCl) was added to HPLC-purified [1-20] cysteinyl peptide (1.56 µmol, final concentration 2 mM), and 4.6 mg [1-20] crypto thioester (1.2 equiv.). The resulted solution was incubated at 37°C for 24 h, then quenched by addition

Thèse accessible à l'adresse : https://theses.insa-lyon.fr/publication/2025ISAL0089/these.pdf © [H. Terrasson], [2025], INSA Lyon, tous droits réservés

of 15 mL of a H_2O/MeCN/AcOH 70:25:5 mixture. The solution was washed three times with 30 ml Et_2O then centrifuged. The precipitate was dissolved in 1 mL 6M Gu.HCl, combined with the supernatant then purified by semi-preparative RP-HPLC to yield 3.3 mg (528 nmol, 34%) of pure BCR4.

The crude or purified peptide should not be kept in HPLC solvents (0.1% TFA) for a prolonged time (>10 h) nor be heated above room temperature under these conditions, and the purified fractions should be lyophilized immediately after purification. Peptide re-dissolved in pure water was however stable for a few weeks at -20°C.

ESI-HRMS (*m/z*): $[M+H]^+$ calcd. for $C_{266}H_{379}N_{62}O_{79}S_6$: 5897.5869, found: 5897.5883.

HPLC analysis: t_R = 18.8 min (gradient: 20-55% B/A over 21 min).

HPLC purification: t_R = 16.5 min (Jupiter C4, gradient: 30-53% B/A over 17 min).

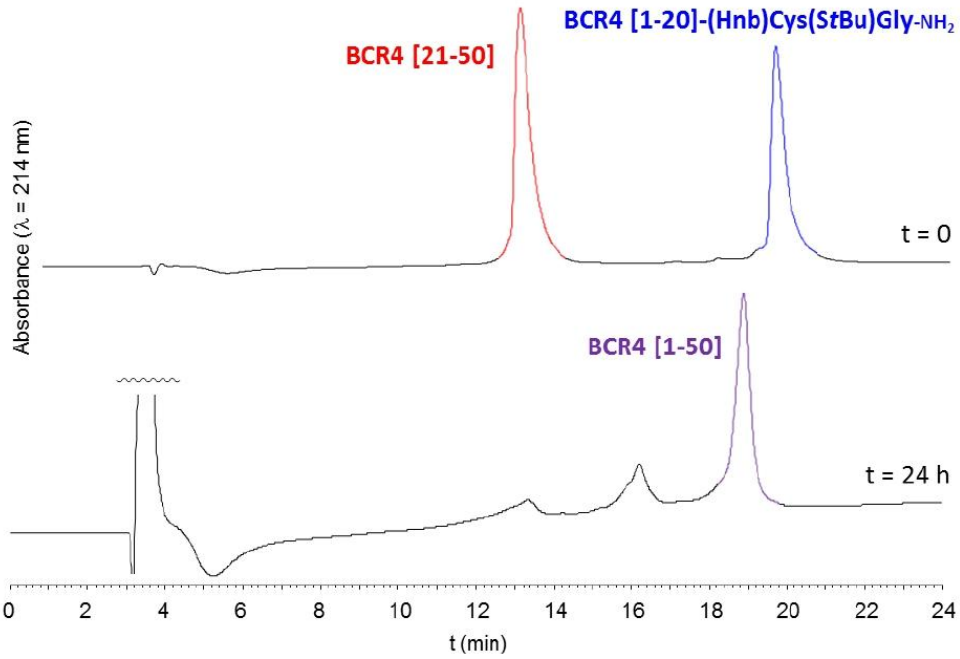


Figure S8: HPLC monitoring of the NCL reaction. Gradient: 20-55% B/A over 21 min.

Thèse accessible à l'adresse : https://theses.insa-lyon.fr/publication/2025ISAL0089/these.pdf © [H. Terrasson], [2025], INSA Lyon, tous droits réservés

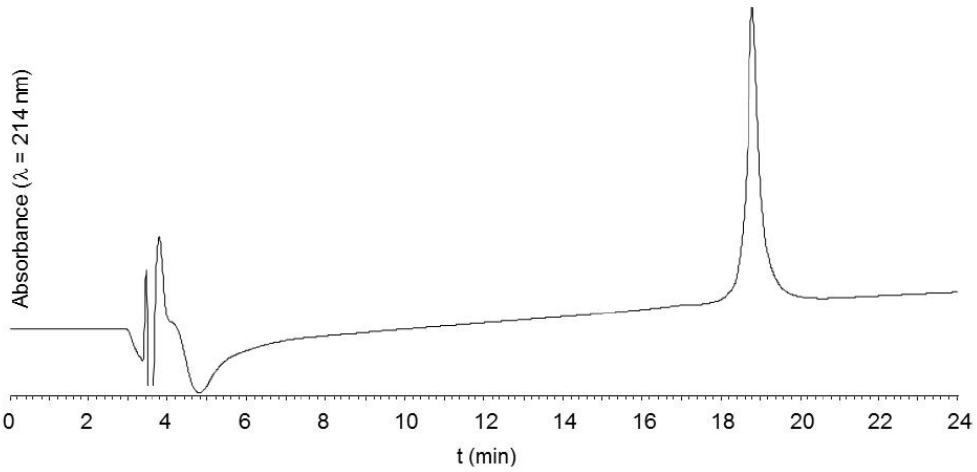


Figure S9: HPLC trace of purified reduced BCR4. Gradient: 20-55% B/A over 21 min.

5. Oxidative folding

Oxidative folding was performed by incubating the reduced peptide (622 nmol) in 20.7 mL (30 µM final concentration) of a deoxygenated buffer containing 0.1 mM oxidized glutathione (10 equiv.), 1 mM glutathione (100 equiv.), 1 mM EDTA, 100 mM TRIS, pH 8.5, at 20 °C, for 48 h under an argon atmosphere. The reaction was acidified by adding TFA (200 µL), and the crude mixture was purified by semi-preparative HPLC to give pure BCR4 (135 nmol, 22%). The crude or purified peptide should not be kept in HPLC solvents (0.1% TFA) for a prolonged time (>10 h) nor be heated above room temperature under these conditions, and the purified fractions should be lyophilized immediately after purification. Peptide re-dissolved in pure water was however stable for several months at -20°C.

ESI-HRMS (*m/z*): $[M+H]^+$ calcd. for $C_{266}H_{373}N_{62}O_{79}S_6$: 5891.5400, found: 5891.5437.

HPLC analysis: t_R = 22.5 min (gradient: 5-50% B/A over 30 min).

HPLC purification: t_R = 25.7 min (Nucleosil C18, gradient: 5-45% B/A over 30 min).

Thèse accessible à l'adresse : https://theses.insa-lyon.fr/publication/2025ISAL0089/these.pdf © [H. Terrasson], [2025], INSA Lyon, tous droits réservés

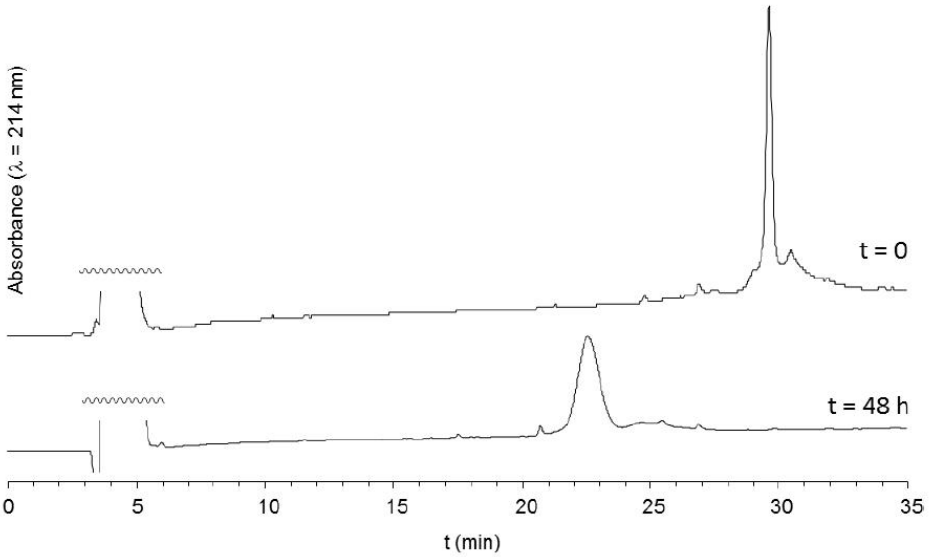


Figure S10: HPLC monitoring of the oxidative folding. Gradient: 5-50% B/A over 30 min.

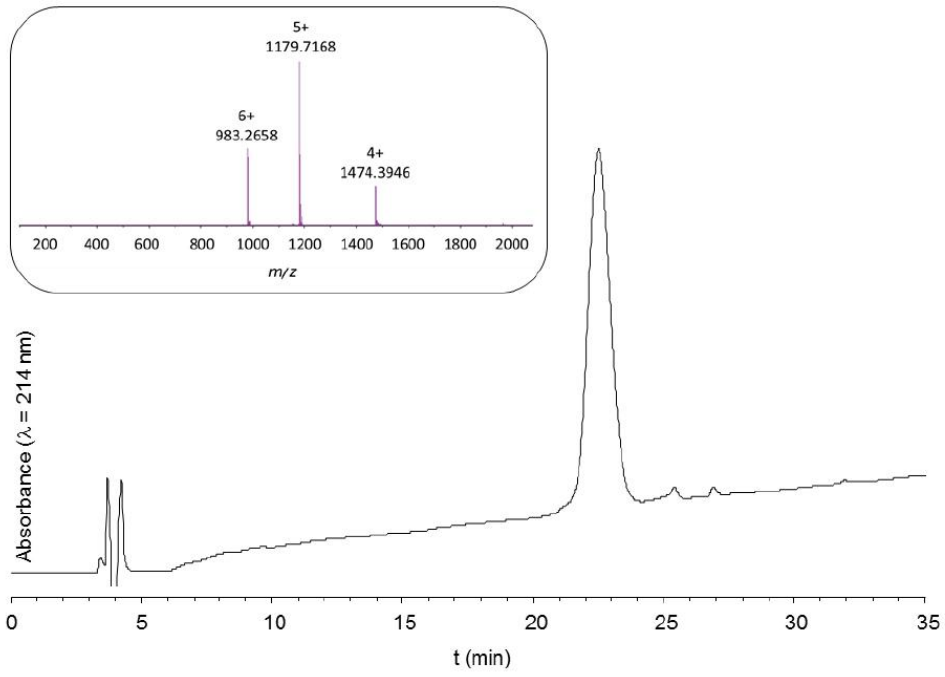


Figure S11: HPLC trace and ESI-HRMS spectrum of purified BCR4. Gradient: 5-50% B/A over 30 min.

Thèse accessible à l'adresse : https://theses.insa-lyon.fr/publication/2025ISAL0089/these.pdf © [H. Terrasson], [2025], INSA Lyon, tous droits réservés

Table S2. Protein sequences of the putative BCR homologs in 22 aphid species which sequences are deposited in publicly available databases.

BCR subfamilies	Protein sequences in aphid species[a]
BCR1-2-4-5	>Apis-BCR1 MKLLHGFLIIMLTMHLSIQYAYGGPFLTKYLCDRVCHKLCGDEFVCSCIQYKSLKGLWFP HCPTGKASVVLHNFLTSP >Apis-BCR2 (ACYPI38738) MKLLYGFLIIMLTIHLSVQYFESPFETKYNCDTHCNKLCGKIDHCSCIQYHSMEGLWFPH CRTGSAAQMLHDFLSNP >Apis-BCR4 MRLLYGFLIIMLTIYLSVQDFDPTEFKGPFPTIEICSKYCAVVCNYTSRPCYCVEAAKER DQWFPYCYD >Apis-BCR5 (ACYPI084619) MRLLYGFLIIMLTIHLSVQDIDPNTLRGPYPTKEICSKYCEYNVVCGASLPCICVQDARQ LDHWFAYCYDGGPEMLM >Apis-BCRnew1 NC_042494.1:96422603..96422806 MRLLYGVLIIMLTIQLSVQYSYYPGRPFVSRHNCEAACTRICGFSNPCSCVQYGSIMWSP HCRSGRAAGSWPGEDPY >Akon-FQ998496.1 BCR1 BCR2 BCR4 BCR5 MRLLYVFLVVMLTMQLSIQYTSGSPFQTRYNCNNICHKLCGSAACACSQYRSLKGMWFPH CANGQAAQVLHNFLSN >Akon-FO015834.1 BCR1 BCR2 BCR4 BCR5 MKYFYGFLIIMLTIHLSVQYHYIESPFETRFGCDNVCYKLCGKRVPCSCVQYDAMNGLWF PHCQEGHAAEELHQFL >Dnox-NW_015368581.1 BCR1 BCR2 BCR4 BCR5 IRLLFGLLTIMLTVHLSIQEDDYPTRKQCNETCIANCRSDPNYEGRWMWCLREAGSEMIG LWYCQC >Mros-WHPZ01509477.1 BCR1 BCR2 BCR4 BCR5 MRFLYGFLIIMLTIHLSVQLSISPFEEKFTCDRICYKLCGNVNKCRCQQYDSLLNLWFPR CSVGNAAIVLHEFLSNP >Mros-WHPZ01494279.1 BCR1 BCR2 BCR4 BCR5 MRFLYGFLIIMLTIHLSIQLFISPFEEKFTCDRICYKLCGNVHKCRCQQYDSLLNLWFPR CSGGNAAIVLHEFLSNP >Mros-WHPZ01338884.1 BCR1 BCR2 BCR4 BCR5 MRFLYGFLIIMLTIHLSVQLSRSPLESRFECENICYSLCGGDNVCNCEQYKSLNNLWFPH CRFGHAAMVLHEFLSSP >Mros-WHPZ01584390.1 BCR1 BCR2 BCR4 BCR5 MRLMFGFLIIMLTINLSVQYSYYPGRPFISKYNCEAACTRICGFSNPCSCLQYDVISSLW FPRCRSGHPAGV >Mros-WHPZ01569289.1 BCR1 BCR2 BCR4 BCR5 MKLLFGFLIIMLTLHLSIQNPYHSDQSYRTKFECENDCSSMCITGYDGQCERLRTVYYLW SCYCTPAG >Smis-CM017799.1-23116456 BCR1 BCR2 BCR4 BCR5 MKLLFGFSIIMLTIHLSVQYSYYPGRPFASKYNCETVCTRICGFSNPCSCLQFDLMNAPL WFPRCRSGHA
BCR3	>Apis-BCR3 (ACYPI44142) MSVRKNVLPTMFVVLLIMSPVTPTSVFISAVCYSGCGSLALVCFVSNGITNGLDYFKSSA PLSTSETSCGEAFDTCTDHCLANFKF >Agly-AG010439-PA BCR3 MWTFILVGLLMMTCVTEASRLNRFMSNVCYFGCLAKRVACFSSTGAIFGTVPYGIIAVTP ALESCTVVFRICKASCIAILILPKI >Dnox-NW_015368357.1 BCR3 MQSRSNVVWPSLFVALLMMSPVTHANIFIAAVCYSGCGSLALVCYVSNGIANGIHYAKTF TSLPPTEVGCGEAFVECKNNCLEHF >Dnox-XP 015363544.1 PREDICTED: uncharacterized protein LOC107161588] BCR3

Thèse accessible à l'adresse : https://theses.insa-lyon.fr/publication/2025ISAL0089/these.pdf © [H. Terrasson], [2025], INSA Lyon, tous droits réservés

MVAQKMWSLILIGLLFSSSANAGPIXAGICYAGCAAVTVACFGAAGFTFGTVPGAVIAAT
PALAACNAAFGICEASCVAALVVPTP
>Mper-MYZPE13164_0_v1.0_000159160.2_pep | 88 aa BCR3
MSARNNMLPSLFIVLLIMSPVTPAHFFIAYVCYAGCGSLAIVCYVSNGIANGIQFAKTAS
ALPPTKISCGQAFNACKDDCLVNFTLTP
>Mcer-Mca00644.t1-protein BCR3
MSARTNVLPSLFVMLLIMSPVAPAHLFIAYVCYAGCGSLALTCYVSNGLANGLEFIKTAS
FLPPTAITCAEAFVACKTDCLENFTLTP
>Tcit-CD450908.1 BCR3
MSARKNILATVFIVLLFSTSVTPTNIFISAVCFSGCGTMLLTCYVITGFEFIKAAVFDDH
LPTSGCRTMYHECTAVCKKSYK
>Rpad-Rp1008 BCR3
MSAQNKMLTSLFIVLLITTSVTPTSIFISSICYSGCGTMAVACYVMTGIQYIMGASGLTT
NGMGCGASFVVCKDSCIESYN
>Rmai-NC_040880.1 BCR3
MSAQNKMLTSLFIVLLITTSVTPTSIFISSICYSGCGTMAVACYVMTGIQYIMGASGLTR
TGLGCGESFVVCKDSCIQSY
>Rmai-XP_026822757.1 BCR3 uncharacterized protein LOC113560848
MVGQKMLSLLMVGLLLSPPALAGPVAAGICYAGCAAVTVACFTAAGFTFGTVPASVIAAT
PVLAACNTAFGVCEASCVAALVVPTP
>Rmai-NC_040879.1 BCR3
MWTFMMAGLLMMICVTEAGPFNRLISNVCYLGCLAERVACFSSSGAIFGTVPYGIIAVTP
ALNTCNAIFKICKVGCIAILISPR
>Sgra-QEWZ01000258.1 BCR3
MSAQNKMLTSLFIVLLMTTSVTPSSIFISSICYSGCGTMAVACYVMTGIQYIMGASGLTR
IGLSCGESFFVCKDSCIQSY
>Sgra-QEWZ01001431.1 BCR3
MWTFIMAGLLMMTCVTEAGPLNRLMSNVCYLGCLAERVACFSSSGAIIGTVPYGIIAVTP
ALNTCTAIFNICKVGCIAILISPR
>Msac-NW_020270519.1 BCR3
MSARNNIFTSLFVVLLMTTSVTPAKIGLSIICYSGCGSVAIGCYVINSFEFLKSFFVPDT
MTSDCGESFDECKYACI
>Msac-XP_025200550.1 BCR3 uncharacterized protein LOC112598338
MVAQKMLSLVLVGLLLSSSAHAGPLTAGICYAGCAAVTVACFSAAGFTFGTVPGAVIAAT
PALAACNAAFGICEASCVAALVVPVP
>Msac-XP_025194587.1 BCR3 uncharacterized protein LOC112594148
MVAQKMLSLVLVGLLLSSSAHAGPLTAGICYAGCAAVTVACFSAAGFTFGTVPGAVIAAT
PALAACNAAFGICEASCVAALVVPVP
>Agos-DR392815.1 BCR3
MSAKKNILATAFIVLLFSTSVTPTNIFISAVCFSGCGTMLVTCYVITGLEILKAAVVDDH
LPTSGCRSMFHECKDVCYRSYR
>Agos-XP_027838196.1 BCR3 uncharacterized protein LOC114120478
MVAHKMLSLVLVGLLLSSTAHAGPLAAGVCYAGCAAVTVACFSAAGFTFGTVPGAIIAAT
PALAACNAAFGICEASCIAALVVPVP
>Acra-KAF0749826.1 BCR3
MTAQKMWTFVLVGLLMMTCVTEASRLNRFMSNVCYFGCLAERVACFSSTGAIFGTVPYGI
IAVTPTLESCTVVFKICKASCIAILISSKI
>Acra-KAF0768549.1 BCR3
MVTHKMLSLVLVGLLLSSSAHAGPLAAGVCYAGCAAVTVACFSAAGFTFGTVPGAIIAAT
PALAACNAAFGVCEASCIAALVVPVP
>Acra-VUJU01000019.1 BCR3
MTAKKNILATVFIVLLFSTSVTPTNIFISAVCFSGCGTMLVTCYVITGLEIIKAAVVDDH
LPKSGCKAMFQECKAICVKSYK
>Cced-VVC36620.1 BCR3
MFARKTIVLLTVLMMFGIAQAGPLAAGICYAGCASVTVACFAAAGFTFGTVPGAVIAATP
ALAACNTAFGICEAACVAALVAPTV
>Pnig-scaffold_705 BCR3

Thèse accessible à l'adresse : https://theses.insa-lyon.fr/publication/2025ISAL0089/these.pdf © [H. Terrasson], [2025], INSA Lyon, tous droits réservés

	MSARKDVLLSVFVAMLMMSSVAPTHILVSVVCYSGCGSMALVCYLSTGIANGLHPSKSTE SSNADCGKSYDSCISDCVLNF **>Pnig-scaffold_2336 BCR3** MLSLILVGLLMMANATEAGRLASNFCYFGCLAERVACFSSSGAILGTVPFGMIAVAPALK TCTAIFGVCKASCFALLLMPII **>Mros-WHPZ01586055.1 BCR3** MSARKNVLPILFVVLLIMSPVTPTSIFISAVCYSGCGSLALVCYVSNGVTIGMDYIKSTV TLPSELTCGEAFDECKDNCLSTFSF **>Mros-WHPZ01559067.1 BCR3** MLSLMLVGLLIASSANAGPLAAGICYAGCAGVTVACFSAAGFTFGTVPGALIAATPALAA CNAAFGICEASCMAALFVP **>Mros-WHPZ01582937.1 BCR3** IWSLMLAGLLIASSANAGPIAAGICYAGCAAVTVACFAAAGFTFGTVPGAVIAATPALAA CNAAFGICEASCVAALVVP **>Asol-PVMI01067726.1 BCR3** MWVKNNMLPSLFIVLLIMSPVTPTSFFIAYVCYAGCGSLALVCYVSNGISNGIQYVKTASV LPPAEIGCAEAFGDCKTDCLENF **>Asol-PVMI01040116.1 BCR3** MWSLILVGLLISASANAGPIAAGVCYAGCAAVTVACFSAAGFTFGTVPGAVIAATPALAAC NAAFGVCEASCMAALFVP **>Smis-CM017802.1 BCR3** MSAQKNVLPALFIMLLIMTPVTPTNVLISAVCYSGCGSLALVCYVYNGISIGVDYFKSSDP LPSLESSCGRSFKRCKDHCLKTFTF **>Smis-SSSL01000270.1 BCR3** LWSLIFVGLSISSSANAGPIAAGICYAGCAAVTVACFSAAGFTFGTVPGALIAATPVVAAC NAAFGICEASFITALIVP
BCR6	**>Apis-BCR6 (ACYPI49532)** MDLFKKFCFVYLILHLTLLLFVDSSDYDDYEERKKYNGSVPNENKTCLIAWETSIMSEPT PTCWIMCKIRCILLSRTTQWRCKISNNQIWENCHCCNDDTSYATFDFY **>Dnox-NW 015369358.1 BCR6** MNLLKKAYFVYFIFIFSLLYGDSYESDEKRAKYNDEDKNSEKTCNVPWSTSVFPEPMTSC YFFCKKRCQALSFTSQWRCEEIVSFAITKCQCCKGEFSNYIYNMY **>Dnox-XP_015376899.1 PREDICTED: uncharacterized protein** **LOC107171180 [Diuraphis noxia] BCR6** MNLLKKACFVYFILVLSLLFVDSFEDGEKRAKYNGDAPNDNRTCNIPWKTSLFSEPYSSC WVMCKGRCIFLSRTTQWRCKKSKYDLLGNCHCCNDDTLNVYFDL **>Mper-MYZPE13164_0_v1.0_000200120.1_pep | 104 aa BCR6** MSLLKKACFVYFIFTLTLLFVSSYEDYERRAKYNADDENDNKTCNIPWETSLMSEPYPSC WLMCKGRCIILSRTTQWRCKMSPNEIFGNCHCCCDDNVNVIYDF **>Mcer-Mc581 BCR6** MNLLKKACFVFFILTLTLLLVSSYEDNEKRAKYNGDDANDNKTCNVPWETSLMSEPYPSC WLMCKGRCILLSRTTQWRCKMSPNEIFGNCHCCGGE **>Save-JK721916.1 BCR6** MSLLRKFCIICLILNLTFLLFADSYDDVDYEPLKKYDGDVPNDNKTCGVTWRTSWLSELT PSCWIVCKVRCIILHRTTQWRCKKSDNPMWENCHCCTD **>Masc-FO024986 BCR6** MNPLKITCFIYFIVLLMSFCVYSKEEVYSKYYDDVPNDNKTCYFPWKTSILPEPYPTCWL MCRLRCIVMSRTSQWRCKKSNHNLQGNCNCCTDN **>Pnig-scaffold_992 BCR6** VYFIYFIVLLMSVGLDSEEEENFSKYYGDMSNDNKTCYDPWQKSLLSEPFLVCWSSCKIR CFILSGTGQFRCKKSYFGVVGNCQCCRDN **>Pnig-scaffold_4247 BCR6** MYLINKTSFISFILLSLICVHVNSDCRGAYNDSATDDKKCCPVAWTTPQLTVIKESYTQC ANNCKTRCLNKRKTPQWQCLANTFTTLYSNCRCCTGEIRKLTYK **>Pnig-scaffold_6689 BCR6** MYLINNTSFIFFILLSLVCVNDAENDTCVYKDSDPNNKKCCPNMGWINVCLDSSGKPKAI DYSNCISNCQSDCNNKKGTKEWACAQMGSLYKCMCCVSEILNKL **>Pnig-scaffold_18197 BCR6** MYFINKTSFISFILLSLVYMHVNGDCLSVDECCSYNWTALLITTPFECDHGCFSNCQSIE HTQNWYCVQDHRHNTGTCYCCTGEIHKLTY

Thèse accessible à l'adresse : https://theses.insa-lyon.fr/publication/2025ISAL0089/these.pdf © [H. Terrasson], [2025], INSA Lyon, tous droits réservés

	>Pnig-scaffold_4321 BCR6 MYLINNTSFIFFILLSLICVNDATNDCCVYNESAPNEKRCCPNDWKEPRLDAAGKYISQE YSTCLCTCKAECKHYLNIQKWACTPDMDYHVCMCCVSEILN >Mros-WHPZ01589938.1 BCR6 MNLLKKICFIYLILNLTFFLFVDSYYDDYEERKKYDGNLPNDNKTCEIPWETSIMSEPTP TCYIMCKVRCIILSRTVQWRCKASSNGIWENCHCCNGE >Mros-WHPZ01474234.1 BCR6 MYFINNLGLFFLILFTLAYVNCDEKGPYSSHDDSEHKKCKIDWVRATDGNGHIMSCSVKC QTKCRYYQNTDQWRCRKSSTGLIKTCECCRGE >Mros-WHPZ01235886.1 BCR6 MYLINNLSLFFLILFTLAYVNCDDERGPYHSSAEDDQKQCMVKWVKATHGGGNIASCLFC KLKCKKKKKTSQWRCRKSKSGLTKKCECCTGE >Asol-PVMI01043125.1 BCR6 MGLLKKACFVYFILTLTLLFVSSYEDYEKRAKYNDYDENENKTCNVPWETSMMSEPYSSC WLMCKGRCIILSRTSQWRCKKSHHEILGNCHCCGGE >Smis-CM017798.1 BCR6 MSLLRKFCIICLILNLTFLLFADSYDDVDYEPLKKYDGDVPNDNKTCGVTWRTSWLSELT PSCWIVCKVRCIILHRTTQWRCKKSDNPMWENCHCCTGE >Smis-CM017799.1-7773692 BCR6 MFLINNSGLIFLILFTLAYVNCDDTPGPYNSGDESDNKKCTIPWVPVTPEEGDTSTCLL KCQTKCSDSQQTDQWRCKSLKKCECCRGE
BCR8	>Apis-BCR8 MSGYAKLLIFAFLLVLSVSQVLGCRGQCWKDVKPRDDFCSEIFRYQYTTMAPANVLCYCC RRFIVED >Agly-AG001416-PA | 80 aa BCR8 MYRYTKVVVFVFILTLSANLANSSSMTTEGYKCPRSHCWTEKEPRDEFCSTIFRYEFATI ELANVFCYCCRRLGSFILQ >Dnox-XR_001505997.1 BCR8 MSHNMKLVIFAFLLILSVCQACGCRNNCWTDIKYRDDYCSELFRYQYTTMDPANVLCYCC RRL >Mper-MYZPE13164_0_v1.0_000003380.1_pep | 66 aa BCR8 MNRNVKLVIFAFLLILSVSQVLGFGCPRGQCWIDKKKRDDFCLEIFRYEHTTMDPANVLC FCCRRL >Mcer-Mc1616 BCR8 MNHNVKLLIFAFLLILSVSQVLGCRGQCWIDIKPRDDFCSEIFRYQYTTIAPENVLCYCC >Akon-FQ999398.1 BCR8 MNGHAKLLIFAFLLILSVSQVLGCRGQCWEEVKPRDDFCSEIFRYQYTTMEPANVLCYCC RRFKLE >Masc-FO018431.1 BCR8 MNRFTQLLIFAILLVLTISQVSACRGNCWTDEKYRDSYCSEIFRYKYRTFDVANVMCHCC RSVI >Rpad-FO059758.1 BCR8 MNRYIQLLVFVILLTLSISQVSGCRGQCWTDVKFRGEFCSQIFRYVYTTMEPANVVCYCC RR >Rmai-NC_040878.1 BCR8 MNRYLQLLVFVILLTLSVSQKSGCRGQCWTDVKFRDEFCSEIFRYVYTTIEPANVVCYCC RR >Agos-NW_021007069.1 BCR8 MYRYTQLVVFVFILTLSASLANSSSVTTEGYKCPRRQCWTEVEPRDEFCSEIFRYEFTIK EPTNVFCYCCRR >Msac-NW_020271346.1 BCR8 MNRYTQLLVLVFLLTLTISQVLGKCRDECWIDFRIRDDSCPLLFRYQYVTAAPANILCFC CR >Acra-KAF0753610.1 BCR8 MYRYTQLVVFVFLFTLSVSLSKSISVTTEGYKCQRGQCWTEVEPRDDFCSEMFRYEFITL PPANVLCYCCRRI >Acra-VUJU01015826.1 BCR8 MYRYMRLVVFVFLLTLSVILARSAPMAEGDTCYRGQCWTEVKPRDDFCSEIFRYDFTSKA NVLCYCFRR

Thèse accessible à l'adresse : https://theses.insa-lyon.fr/publication/2025ISAL0089/these.pdf © [H. Terrasson], [2025], INSA Lyon, tous droits réservés

	>Acra-VUJU01005956.1 BCR8 MYRYMQLVVFVFLLTLSVSLAKSDPIVEGDTCFRGQCWTEVKPRDDFCTDIFRYNFTSKA NELCYCCRR **>Pnig-scaffold 94 BCR8** MNRYTQLLIFAILLILTVNQALACRGNCWIDEKYRDSFCSEIFRYKYKIPNPVNILCHCCRR **>Mros-WHPZ01587143.1 BCR8** MNGQAKLLIFAFLLILTVSQVLGCRGRCWEDVKFRDDFCSEIFRYQYTTMKPAKALCYCCRRFKIE **>Mros-WHPZ01588751.1 BCR8** MNRTTYMVILAIIVVFCLSVTVMGCETNCWLNDWTTRDSACNGRVRYSYPGPSNGRCYCCQ **>Asol-PVMI01009763.1 BCR8** MNCNVKLLIFAFLLILSVSHVLGCRGNCWIDLKYRDNFCSEIFRYQYTTMEPANVLCYCCRR **>Smis-CM017797.1-29839389 BCR8** MNSTVKLLIFAFLLILSVSQVLGCKGQCWKDAEPRDDFCSQEFRYQYLTSKPANVLCYCC **>Smis-CM017797.1-29874451 BCR8** MNRTTYMVILAIIVIVCLSVTVMGCEKNCWLNDWRTRDAACNDRVKYSYPGPVHGKCYCCR

[a] **Abbreviations:** Acra, *Aphis craccivora*; Agly, *Aphis glycines*; Agos, *Aphis gossypii*; Akon, *Acyrthosiphon kondoi*; Apis, *Acyrthosiphon pisum*; Asol, *Aulacorthum solani*; Cced, *Cinara cedri*; Dnox, *Diuraphis noxia*; Masc, *Myzus ascalonicus*; Mcer, *Myzus cerasi*; Mper, *Myzus persicae*; Msac, *Melanaphis sacchari*; Mros, *Macrosiphum rosae*; Pnig, *Pentalonia nigronervosa*; Rmai, *Rhopalosiphum maidis*; Rpad, *Rhopalosiphum padi*; Save, *Sitobion avenae*; Sgra, *Schizaphis graminum;* Smis, *Sitobion miscanthi;* Tcit, *Toxoptera citricida*. No BCR were found in Elan, *Eriosoma lanigerum* and *Sfla, Sipha flava*.

Thèse accessible à l'adresse : https://theses.insa-lyon.fr/publication/2025ISAL0089/these.pdf © [H. Terrasson], [2025], INSA Lyon, tous droits réservés

2) Matériel supplémentaire du Chapitre 2

Thèse accessible à l'adresse : https://theses.insa-lyon.fr/publication/2025ISAL0089/these.pdf © [H. Terrasson], [2025], INSA Lyon, tous droits réservés

Supplementary material

Title: Strong impact of orally administered BCR4 defensin on aphid survival, embryo development and symbiotic cells in three *Acyrthosiphon pisum* parthenogenetic lines

Hugo Terrasson[1], Karen Gaget[1], Garance Lapetoule[1], Isabelle Rahioui[1], François Renoz[2], Sylvain Benhamou[1], Chrystèle Jouve[1], Catherine Sivignon[1], Gabrielle Duport[1], Vincent Aucagne[3], Jean-Christophe Simon[4], Mélanie Ribeiro Lopes[1], Federica Calevro[1,#] and Pedro Da Silva[1,#]

Affiliations :

[1]: INSA Lyon, INRAE, BF2I, UMR203, 69621 Villeurbanne, France

[2]: UCLouvain, Biodiversity Research Centre, Earth and Life Institute, Louvain-la-Neuve, Belgium

[3]: Centre de Biophysique Moléculaire, CNRS UPR 4301, 45071 Orléans, France

[4] : INRAE, UMR IGEPP, Institut Agro, Université de Rennes, Le Rheu, France

Corresponding authors: Federica Calevro**,** e-mail address: federica.calevro@inrae.fr and Pedro Da Silva, e-mail address: pedro.da-silva@insa-lyon.fr

Thèse accessible à l'adresse : https://theses.insa-lyon.fr/publication/2025ISAL0089/these.pdf © [H. Terrasson], [2025], INSA Lyon, tous droits réservés

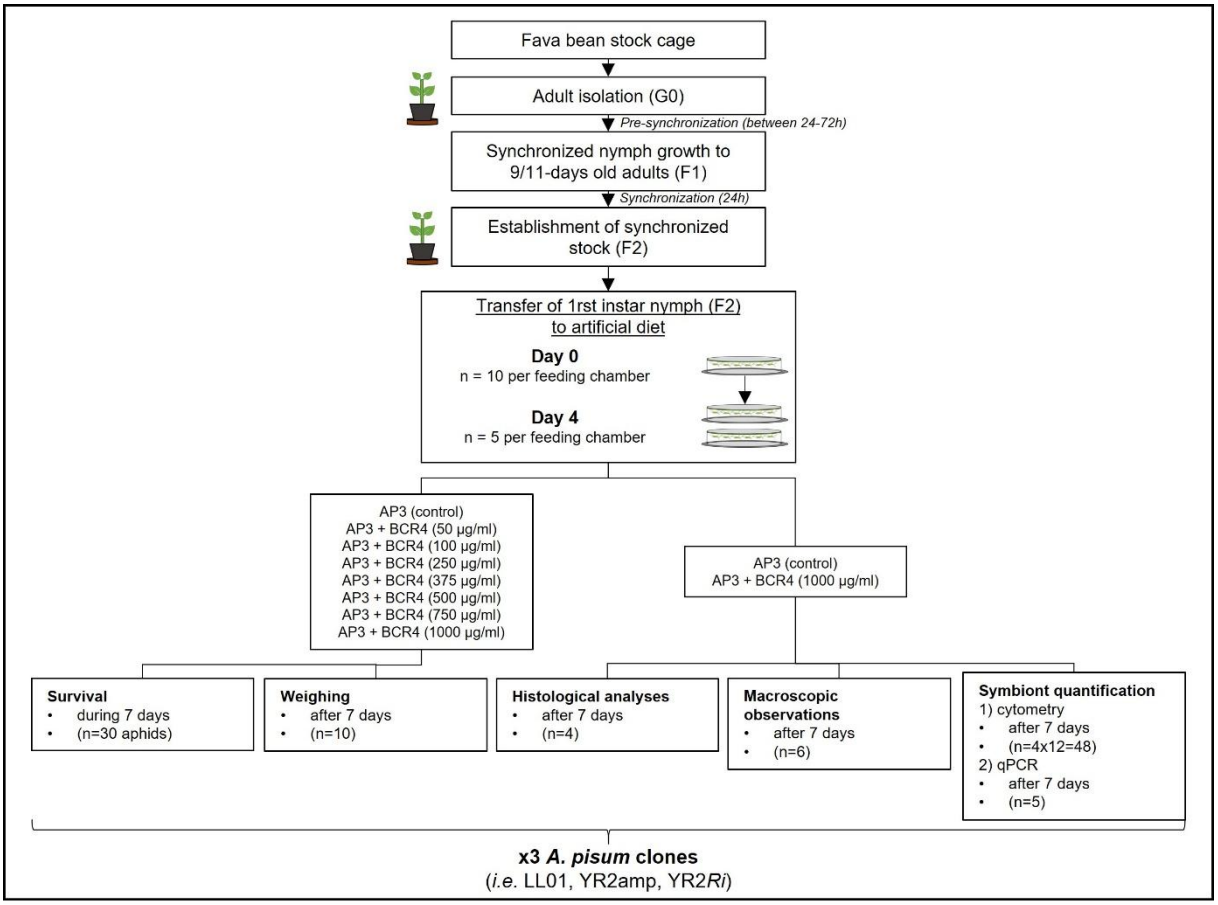


Fig. S1 Experimental design used for observations and phenotypic measurements of aphids after BCR4 ingestion

Thèse accessible à l'adresse : https://theses.insa-lyon.fr/publication/2025ISAL0089/these.pdf © [H. Terrasson], [2025], INSA Lyon, tous droits réservés

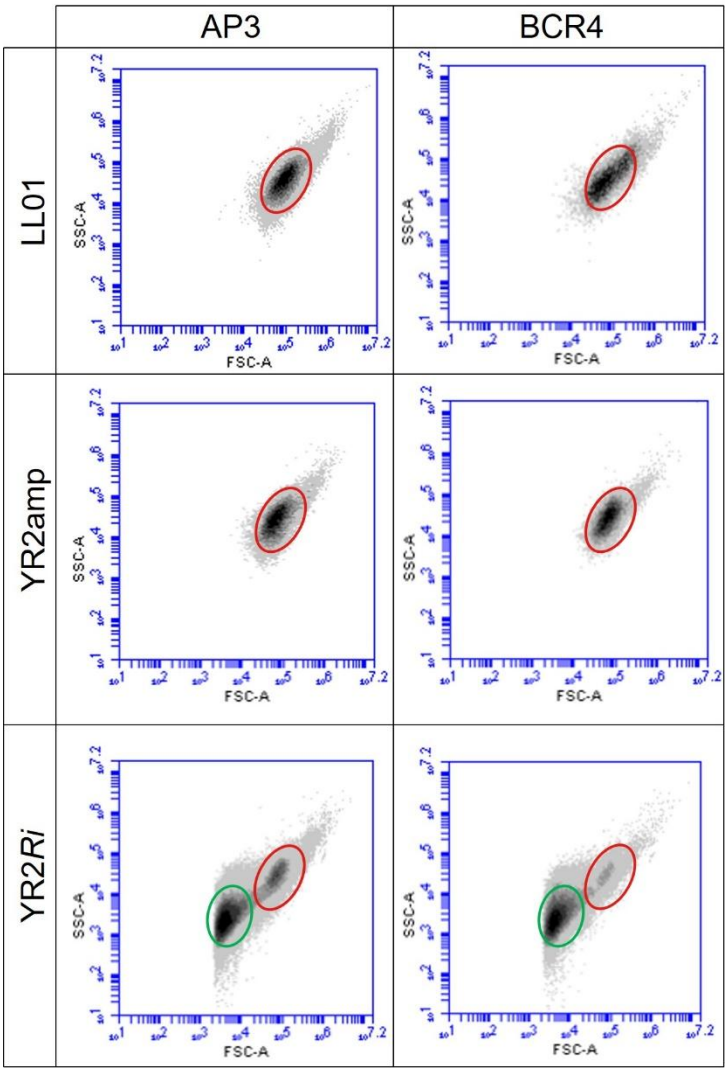


Fig. S2 Symbiont identification by flow cytometry in *Acyrthosiphon pisum* lines. Cells identified as symbionts were represented on density plot (FSC-A/SSC-A), the grey gradient indicating increasing density of dots. The *B. aphidicola* population (red circle) is defined according to the parameters described by Simonet *et al.* (2016), while a second population (green circle) is observed only in YR2-*Ri* lines and corresponds to the secondary symbiont *R. insecticola*

Thèse accessible à l'adresse : https://theses.insa-lyon.fr/publication/2025ISAL0089/these.pdf © [H. Terrasson], [2025], INSA Lyon, tous droits réservés

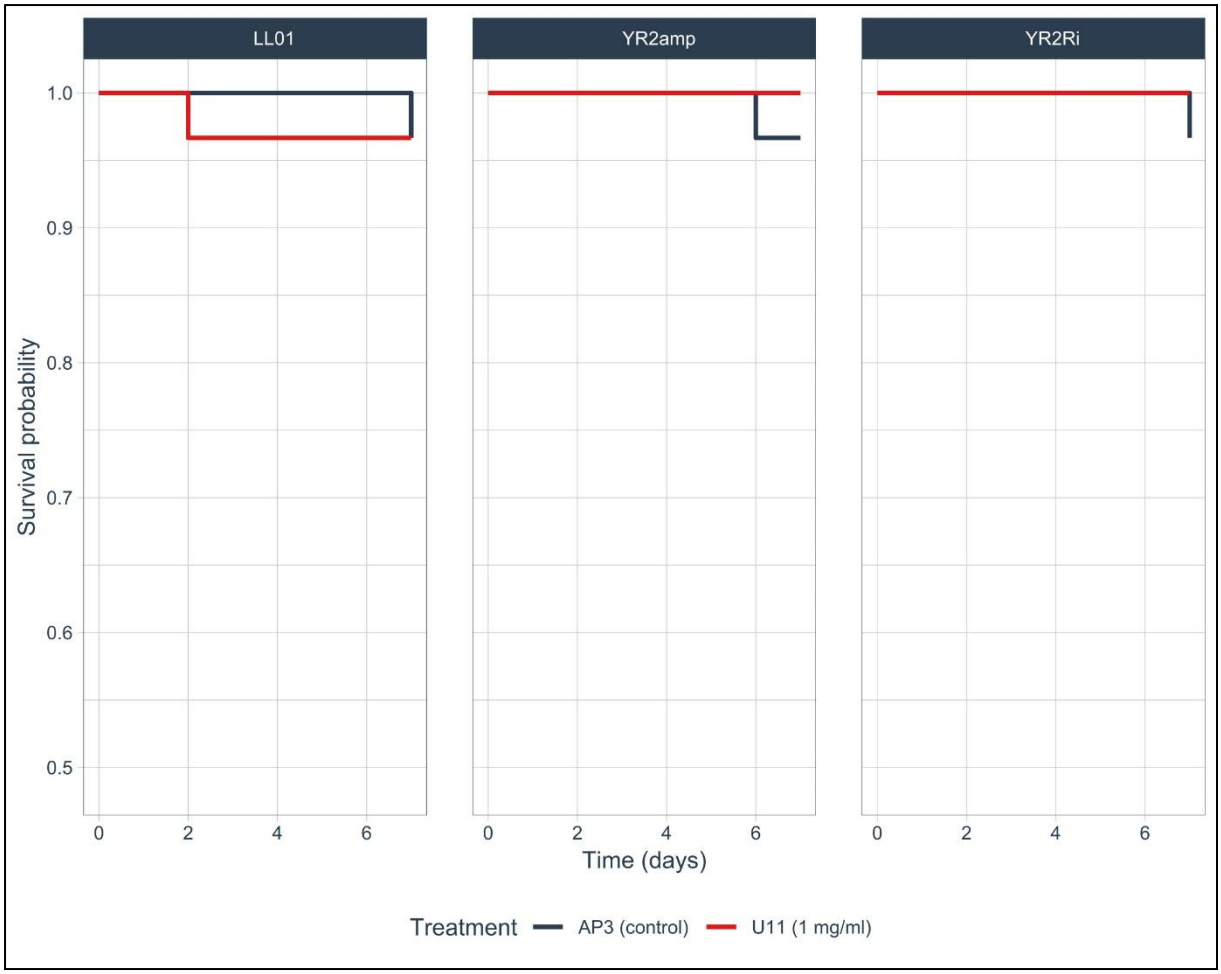


Fig. S3 Survival curves of aphid fed on AP3 only (negative control, grey lines) or on AP3 containing 1mg/ml of U11 peptide (red lines) during seven days. Left, central and right panels correspond to survival curves of LL01 line, YR2-amp line and YR2-*Ri* line, respectively. n=30 for each BCR4-concentration group for each line

Thèse accessible à l'adresse : https://theses.insa-lyon.fr/publication/2025ISAL0089/these.pdf © [H. Terrasson], [2025], INSA Lyon, tous droits réservés

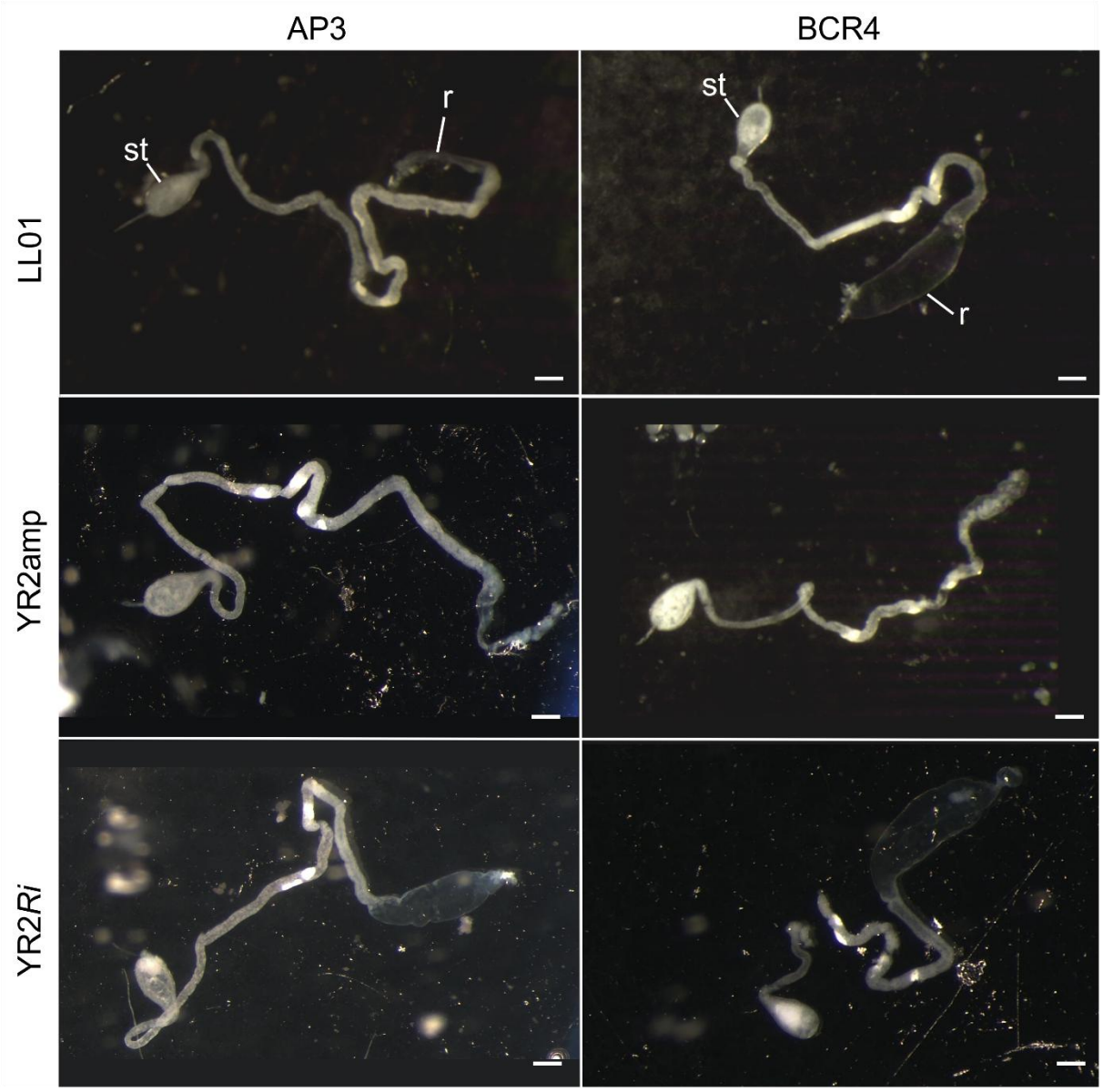


Fig. S4 Dissection of digestif tracts from three *Acyrthosiphon pisum* lines after ingestion of AP3 (control, left panels) or AP3 complemented with 1000 µg/ml of BCR4 peptide (right panels) for seven days. st = stomac; r = rectum. Scalebar = 200 µm

Thèse accessible à l'adresse : https://theses.insa-lyon.fr/publication/2025ISAL0089/these.pdf © [H. Terrasson], [2025], INSA Lyon, tous droits réservés

Table S1. Oligonucleotides used in this study

Target	Organisme	Name	Sequence, 5′–3′	Orientation	Source
AlexaFluor-labeled probes for fluorescent in situ hybridization targeting B. aphidicola and R.insecticola 16S rRNA :					
16S rRNA	*B.aphidicola*	Alexa488-Buch	CACCTAGAATTCTACCTCCCTCT	Antisense	This study
16S rRNA	*R.insecticola*	Alexa594-Reg	GTAGCAAGCTACTCCCCGAT	Antisense	This study

Thèse accessible à l'adresse : https://theses.insa-lyon.fr/publication/2025ISAL0089/these.pdf © [H. Terrasson], [2025], INSA Lyon, tous droits réservés

Thèse accessible à l'adresse : https://theses.insa-lyon.fr/publication/2025ISAL0089/these.pdf © [H. Terrasson], [2025], INSA Lyon, tous droits réservés

FOLIO ADMINISTRATIF

THESE DE L'INSA LYON, MEMBRE DE L'UNIVERSITE DE LYON

NOM : TERRASSON DATE de SOUTENANCE : 27/10/2025

Prénoms : Hugo

TITRE : Rôle des peptides « Bacteriocyte-specific Cysteine-Rich » dans le contrôle de la symbiose chez *Acyrthosiphon pisum*

NATURE : Doctorat Numéro d'ordre : 2025ISAL0089

Ecole doctorale : Évolution, Écosystèmes, Microbiologie, Modélisation (E2M2)

Spécialité : Micro-organismes, interaction, infections

RESUME :
Chez de nombreux insectes, la colonisation de milieux présentant des régimes alimentaires pauvres ou déséquilibrés repose sur des associations durables avec des bactéries symbiotiques capables de compléter leurs besoins nutritionnels. Ces symbioses nutritionnelles, particulièrement fréquentes chez les insectes Hémiptères, jouent un rôle central dans l'adaptation et la diversification évolutive de leurs hôtes. Ces symbiotes sont obligatoires et intracellulaires et sont hébergés dans des cellules spécialisées appelées bactériocytes. Chez les pucerons, ce symbiote nutritionnel ayant permis leur adaptation à la sève phloémienne des plantes est *Buchnera aphidicola*. La densité de cette bactérie est finement régulée en réponse aux besoins changeants de l'insecte. Chez d'autres insectes symbiotiques, plusieurs études ont montré que le système immunitaire, et notamment les peptides antimicrobiens (AMP), peuvent être détournés pour contrôler la densité ou la localisation des symbiotes. Chez les pucerons cette immunité humorale est fortement réduite, les mécanismes impliqués dans la régulation des symbiotes restent mal compris. Récemment, une famille de peptides riches en cystéines, exprimés spécifiquement dans les bactériocytes du puceron du pois *Acyrthosiphon pisum*, a été identifiée. Ces peptides « Bacteriocyte-specific Cysteine-Rich » (BCR) présentent une structure évoquant celle des défensines, une catégorie d'AMP, suggérant un rôle potentiel dans le contrôle de la symbiose. Cette thèse explore la diversité, la structure et la fonction de ces peptides. Une analyse de similarité de séquence (BLAST), couplée à des reconstructions phylogénétiques, a permis d'identifier 76 homologues des BCR présents uniquement chez les pucerons (Aphididae). Cette analyse a également montré la présence de quatre sous-familles distinctes de BCR, suggérant une possible diversification fonctionnelle. L'analyse structurale de BCR4, réalisée par résonnance magnétique nucléaire après synthèse et repliement du peptide, a révélé que ce peptide appartient à une nouvelle famille structurale de défensines. *In vitro*, BCR4 présente une activité bactéricide spécifique contre des bactéries à Gram négatif, phylogénétiquement proches du symbiote *B. aphidicola*. L'effet de l'ingestion de BCR4 a ensuite été évaluée chez trois lignées d'*A. pisum*, différant par leur fond génétique et par la présence ou non du symbiote facultatif *Regiella insecticola*. L'exposition à BCR4 entraîne une mortalité accrue, une réduction de la masse corporelle, un arrêt du développement embryonnaire, ainsi qu'une diminution drastique du nombre de symbiotes par rapport au contrôle. Ces résultats suggèrent une activité entomotoxique de BCR4, associée à une perturbation de la symbiose possiblement par un effet direct sur *Buchnera*, qui est plus sensible au traitement que *R. insecticola*. Enfin, grâce à un anticorps spécifique développé au cours de cette thèse, ce peptide a été localisé pour la première fois au niveau protéique dans les bactériocytes du puceron du pois. Des expériences d'immunohistochimie ont permis de déterminer la localisation subcellulaire de BCR4 à différents stades de développement. Le peptide forme un réseau dans tout le cytoplasme, autour des symbiotes, avec une organisation qui évoque celle du réticulum endoplasmique. Des « puncta » de BCR4 sont aussi observés dans le cytoplasme, suggérant un possible transport actif du peptide. Ces observations confirment la traduction effective du peptide et renforcent l'hypothèse d'une interaction directe avec *B. aphidicola*. En conclusion, cette thèse met en évidence un rôle probable de BCR4 dans la régulation de la symbiose chez le puceron. Elle suggère l'existence, chez les pucerons, d'un système immunitaire alternatif reposant sur des peptides spécialisés, ouvrant de nouvelles perspectives sur l'évolution de l'immunité en lien avec le contrôle symbiotique chez les insectes.

MOTS-CLÉS : Symbiose nutritionnelle, *Acyrthosiphon pisum*, *Buchnera aphidicola*, Bacteriocyte-specific Cysteine-Rich, peptides antimicrobiens, bactériocytes

Laboratoire (s) de recherche : UMR 0203 INRA / INSA de Lyon BF2I (Biologie Fonctionnelle Insectes et Interactions)

Directeurs de thèse : P. Da Silva et F. Calevro

Président de jury : S. Duperron

Composition du jury :
Rapporteurs : S. Duperron et P. Mergaert
Examinateur : O. Duron,
Directeurs de thèse : P. Da Silva et F. Calevro
Encadrante de thèse : M. Ribeiro Lopes

Thèse accessible à l'adresse : https://theses.insa-lyon.fr/publication/2025ISAL0089/these.pdf © [H. Terrasson], [2025], INSA Lyon, tous droits réservés