

Etude de gènes impliqués dans la croissance des pattes et dans la segmentation antéro-postérieure des embryons de Gerridae

Amélie Decaras

▶ **To cite this version:**

Amélie Decaras. Etude de gènes impliqués dans la croissance des pattes et dans la segmentation antéro-postérieure des embryons de Gerridae. Sciences du Vivant [q-bio]. 2017. hal-01670690

HAL Id: hal-01670690
https://ephe.hal.science/hal-01670690

Submitted on 21 Dec 2017

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

MINISTÈRE DE L'ENSEIGNEMENT SUPÉRIEUR ET DE LA RECHERCHE

ÉCOLE PRATIQUE DES HAUTES ÉTUDES
Sciences de la Vie et de la Terre

MÉMOIRE

présenté
par
Decaras Amélie

pour l'obtention du Diplôme de l'École Pratique des Hautes Études

TITRE : Etude de gènes impliqués dans la croissance des pattes et dans la segmentation antéro-postérieure des embryons de Gerridae.

soutenu le 5/12/2017 **devant le jury suivant :**

Mme Stéphanie Manel **- Présidente**
M. Abderrahman Khila **- Tuteur scientifique**
M. Jean Marie-Exbrayat **- Tuteur pédagogique**
Mme Muriel Grammont **- Rapporteure**
M. François Payre **- Examinateur**

Mémoire préparé sous la direction de :
M. Abderrahman Khila
Intitulé de la structure d'accueil : UMR 5242 - Génomique du développement et évolution, Institut de Génomique Fonctionnelle de Lyon (IGFL)
Directeur : M. Abderrahman Khila
CNRS

et de

M. Jean-Marie Exbrayat
Intitulé de la structure d'accueil EPHE : UMRS 449 Biologie générale – Reproduction et Développement comparé, UCLy/EPHE, Lyon
Directeur : M. Jean-Marie Exbrayat
EPHE (Sciences de la Vie et de la Terre)
Groupe de Recherche et d'Enseignement Thématiques de l'EPHE : Les Cellules et leur Environnement : Dynamique des Interactions (CEDI)

Remerciements

Je voudrais tout d'abord remercier Abderrahman Khila, ou plutôt comme nous l'appelons tous « Abdou ». Je te remercie pour m'avoir accueillie dans ton laboratoire. Tu m'as permis de me forger une opinion scientifique critique et plus poussée. Durant ces trois années tu m'as soutenue dans mon projet d'étude. Merci pour m'avoir mis en relation avec d'autres chercheurs, cela m'a été indispensable dans l'enrichissement de mes connaissances scientifiques. Enfin je voudrais te remercier pour tes encouragements et ta confiance inépuisable, cela m'a permis d'avoir plus confiance dans mes aptitudes à travailler dans la recherche.

Merci aux membres de mon jury qui ont pris du temps pour moi, pour mon mémoire et ma soutenance. Pour avoir accepté d'évaluer mon travail je vous suis vraiment reconnaissante. Merci à vous : Stéphanie Manel, Jean Marie-Exbrayat, Muriel Grammont, Abderrahman Khila, François Payre.

Je tiens également à remercier Hugo Aguilaniu sans lequel je n'aurais certainement pas continué dans la science, merci infiniment pour tes encouragements et ta confiance dans mes compétences.

Je souhaite remercier encore une fois François Payre pour m'avoir permis de contribuer à cet incroyable projet, ainsi que chaque chercheur avec qui nous avons pu écrire cette histoire : William Toubiana, Hélène Chanut, Miriam Rosenberg, Martin Klingler et Suparna Rey.

Merci à Augustin Le Bouquin, Cédric Finet, et William Toubiana avec qui j'ai pu travailler lors de mon stage. J'ai beaucoup aimé collaborer avec vous, merci beaucoup pour votre aide, vos conseils, vos critiques et votre incroyable bonne humeur. Merci pour votre grand soutien.
Merci également à Pauline Joncour qui m'a beaucoup aidé avec mes analyses statistiques.

Thank you Emilia Santos, you really helped me in all the scientific and personal aspects during these three years. Even when I no longer believed in science and myself you found the good words, thank you very much.

Je voudrais aussi exprimer ma reconnaissance envers Peter Refki, lorsque je suis arrivée tu m'as beaucoup aidé, tu as répondu à toutes mes questions même si tu étais en pleine rédaction de thèse. Merci beaucoup pour toutes tes explications elles m'ont été indispensables.

Merci aux deux animaliers pour vous être bien occupés de mes bêtes merci encore Marie Bernard et Antoine Melet.

Je souhaite remercier tous les autres membres de l'équipe qui ont également contribué à m'épanouir dans le monde de la recherche et dans notre labo. Merci à Aïdamalia Vargas Lowman, Antonin Crumière, David Armisen, François Bonneton, Mathilde Bouchet, Roberto Arbore, Séverine Viala et Vitoria Tobia Santos.

Merci à tous les membres de l'IGFL et à tous les chercheurs enseignants de l'EPHE qui ont aussi aidé à ma formation et mon enrichissement.

Table des matières

I. Introduction 1

1. Concept d'évolution 1
2. Concept de l'Evo-Devo 7
3. Objectif du laboratoire et modèle d'étude 11
4. Exemples d'évolutions et d'adaptations 15

II. Objectif du projet d'étude 27

III. Matériel & méthode 29

IV. Résultats 33

Chapitre A : Adaptation des Gerridae à la surface aquatique 33

1. Introduction 33
2. Résultats 33
3. Discussion 49
4. Conclusions & Perspectives 52

Chapitre B : Fonction et expression des gènes *svb, pri* et *Ubr3* 55

1. Introduction 55
2. Résultats 59
3. Discussion 79
4. Conclusions & perspectives 81

V. Bibliographie 84

VI. Annexes 92

1. Protocoles 93
2. Résultats 105

Résumé (quatrième de couverture) .....

Liste des figures

Figure 1 : Schéma explicatif des molécules impliquées dans le phénotype d'un individu. 2
Figure 2 : Dessins présentant la sélection naturelle 4
Figure 3 : Comparaison embryologique entre différentes espèces 6
Figure 4 : Les gènes Hox, famille de gènes conservés entre différentes espèces 8
Figure 5 : Principaux groupes de Gerromorpha 10
Figure 6 : Morphologie généralisée et simplifiée des Gerromorpha 10
Figure 7 : Phylogénie des insectes semi-aquatiques 12
Figure 8 : Comparaison de la taille des pattes d'une espèce terrestre *O. fasciatus* avec deux espèces semi-aquatiques : *M. mulsanti* et *A. paludum* 14
Figure 9 : Phylogénie des insectes semi-aquatiques en considérant la taille des pattes 14
Figure 10 : Schéma récapitulatif du patron d'expression et de la fonction d'*Ubx* 16
Figure 11 : Schéma récapitulatif du patron d'expression et de la fonction de *gilt* chez les Gerromorpha. 18
Figure 12 : Gènes impliqués dans la segmentation chez la Drosophile 20
Figure 13 : Exemple de différences d'expression des gènes impliqués dans la segmentation entre une espèce long-germ band et short germ band 22
Figure 14 : Différences d'expression et de fonction du gène *Hox proboscipedia* entre différentes espèces d'Arthropodes et d'insectes 24
Figure 15 : Espèces modèles utilisées pour l'étude 28
Figure 16 : Organigramme des étapes de biologie moléculaire du projet d'étude 30
Figure 17 : Développement embryonnaire *d'A. paludum* 32
Figure 18 : Profil d'expression des gènes de la liste à partir du transcriptome 36
Figure 19 : ARNi des gènes *Sp-like* et *TfAP-2* 40
Figure 20 : ARNi des gènes *ftz-f1* et *Iro-like.* 44
Figure 21 : Taille des pattes et des segments pour les embryons *Iro-like*^{ARNi} et *ftz-f1*^{ARNi} 46
Figure 22 : Annotation de la séquence du gène *ovo/svb* de *G. buenoi* 56
Figure 23 : ARNi du gène *ovo/svb* 58
Figure 24 : Marquages de gènes impliqués dans la segmentation chez des embryons *svb*^{ARNi} 60
Figure 25 : Malformation de la cuticule pour les embryons svb^{ARNi} 60
Figure 26 : ARNi du gène *pri* 63
Figure 27 : Marquages *dll, Ubx* et *Abda* sur *pri*^{ARNi} 64
Figure 28 : ARNi du gène *Ubr3* 66
Figure 29 : Hybridation in situ des gènes *svb* et *pri* 68
Figure 30 : Récapitulatif de la fonction des gènes *svb, pri* et *Ubr3* chez les cinq espèces étudiées 72
Figure 31 : Récapitulatif de l'expression de *svb, pri* et *Ubr3* chez les cinq espèces étudiées 74
Figure 32 : Réactivation de *svb* dans les embryons de *D. melanogaster* 76

Liste des tableaux

Tableau 1 : Liste des gènes du crible et taux d'expression à partir du transcriptome 34
Tableau 2 : Pourcentage des modifications observées pour *Sp-like*^{ARNi} 38
Tableau 3 : Pourcentage des modifications observées pour *TfAP-2*^{ARNi} 38
Tableau 4 : Pourcentage des modifications observées pour ftz-f1^{ARNi} (3.6µg/µL ARNdb) 42
Tableau 5 : Pourcentage des modifications observées pour ftz-f1^{ARNi} (1µg/µL ARNdb) 42
Tableau 6 : Pourcentage des modifications observées pour ftz-f1^{ARNi} (0.1µg/µL ARNdb) 42
Tableau 7 : Pourcentage des modifications observées pour *Iro-like*^{ARNi} (femelle A et B) 43
Tableau 8 : Pourcentage des modifications observées pour Iro-like^{ARNi} (femelle C et D) 43
Tableau 9 : Récapitulatif des segments affectés par l'ARNi pour les gènes *Iro-like* et *ftz-f1* 46
Tableau 10 : Pourcentage des modifications observées pour *ovo/svb*^{ARNi} (100ng/µL ARNdb) 57
Tableau 11 : Pourcentage des modifications observées pour exon spécifique *svb*^{ARNi} (100ng/µL ARNdb) 57
Tableau 12 : Pourcentage des modifications observées pour *pri*^{ARNi} (100ng/µL ARNdb) 62
Tableau 13 : Pourcentage des modifications observées pour *pri*^{ARNi} (10ng/µL ARNdb) 62
Tableau 14 : Pourcentage des modifications observées pour *Ubr3*^{ARNi} (5ng/µL ARNdb) 66

Liste des abréviations

- A1 à A8 : segments abdominaux 1 à 8
- Ab : appendices buccaux
- ADN : Acide DésoxyriboNucléique
- ADNc : ADN complémentaire
- An: Antenne
- Ap : appendice
- Aq : *Aquarius paludum*
- ARN: Acide RiboNucléique
- ARNdb : ARN double brin
- ARNi : ARN interférent
- ARNm: ARN messager
- Ct : Trichobothria Céphalique
- Cx : Coxa
- Di: disque imaginal
- Fe : fémur
- FT : facteur de transcription
- FW : Fore Wing en anglais (aile avant)
- Gx : gonocoxa
- HIS : Hybridation In Situ
- HW: Hind Wing en anglais (aile arrière)
- Int: Intercalaire
- La : Labium
- Lm: Labrum
- Meso : *Mesovelia mulsanti*
- MCS : Site de Clonage Multiple
- Mn : mandibule
- Mx: maxillaire
- OS : ocular setae en anglais (sphères oculaires)
- P1, P2, P3: Pattes 1, 2, et 3
- PCR : réaction en chaîne par polymérase
- PL : Pronotonal Lobe en anglais (lobe du pronotum)
- RPKM : Reads Per Kilobase Million
- Segmentation A-P : Segmentation Antéro-postérieure
- Segmentation P-D : Segmentation Proximo-distale
- T1, T2, T3 : segments Thoraciques 1, 2 et 3
- Ta : Tarse
- Ti : Tibia
- Tr : Trochanter
- WT : Wild Type en anglais (sauvage)

- Gènes :
- Abd-A: abdominal A
- Bcd: Bicoid
- Eve: Even-skipped
- Ftz: Fushi tarazu
- Gilt: Gamma-Interferon-Inducible Lysosomal Thiol Protein
- Hb: hunchback
- Otd: orthodenticle
- Pb: proboscipedia
- Ubx : Ultrabithorax
- Wingless: Wg
- Pri : polished rice peptides
- Ubr3 : ubiquitin protein ligase E3
-
- Pour les autres abréviations de gènes confer (Tab.1).

I. Introduction

1. Concept d'évolution

a. Historique & théorie de l'évolution

L'histoire de la biologie évolutive débute au XVIII siècle où nombre de protagonistes ont commencé à élaborer la théorie de l'évolution, en passant par Lamarck (1744-1829), Wallace (1823-1913), puis Darwin (1809-1882). Elle est constamment repensée par les chercheurs sur la base des idées de l'époque. Remettant en cause une des questions les plus fondamentales que l'humanité ait posée : quelle est l'origine de la vie ? À cette époque, seule la religion fournissait une explication à la diversité des espèces, cette théorie va donc bouleverser l'histoire et les pensées de chacun.

La théorie de l'évolution démarre avec une observation toute simple : l'ensemble des espèces présente de grandes différences **phénotypiques** (visibles), mais lorsque l'on compare chacune d'elles avec attention, bon nombre d'entre elles révèle des similitudes intrigantes. Grâce à l'étude des fossiles et l'observation de nombreuses espèces durant ses voyages, Charles Darwin réalise que même des espèces qui semblaient totalement différentes sont capables de montrer des traits de caractères semblables, mais aussi que ce nombre de ressemblances est bien plus important qu'attendu (Darwin and Beer, 1951).

De ces observations découlent ses hypothèses relatées dans son ouvrage *De l'Origine des espèces* (1859): diverses espèces seraient apparues progressivement à partir d'un unique ancêtre commun (Darwin, 1859). Au fil du temps, peu à peu, cette multitude d'espèces se seraient diversifiées pour donner le nombre d'espèces que l'on connait aujourd'hui. Cependant, certaines des espèces fossilisées qu'il observe ne sont plus présentes dans la nature qu'il étudie à cette époque. Il conclut donc que ces espèces n'ont pas réussi à survivre au fil des années, car elles n'étaient pas adaptées à leur milieu naturel. Il explique ce principe à l'aide d'un concept qu'il appellera **sélection naturelle**.

Toutefois une question persiste : par quel moyen ces traits communs que Darwin a observés entre les espèces sont-ils transmis ? Il faudra attendre 1866 et l'étude de Mendel sur les petits pois pour comprendre que ces **caractères sont transmis** de génération en génération (Bateson and Mendel, 2013). Néanmoins les travaux de Mendel furent grandement critiqués et certains chercheurs ne furent pas convaincus sur l'existence de ces caractères transmissibles. Les théories de Mendel et Darwin furent donc très difficiles à admettre par la communauté scientifique et encore plus par la société.

A partir du XX^{ème} siècle, des nouvelles découvertes sont réalisées avec l'étude des **chromosomes** grâce aux expériences de Hunt Morgan sur la Drosophile (Morgan, 1911), puis sur **l'ADN** (acide désoxyribonucléique) avec l'analyse de sa structure par Watson et Crick (Watson and Crick, 1953). Un sens biologique est alors donné à ces caractères transmissibles. Par la suite, les connaissances en génétique et en biologie moléculaire permettront d'apporter des preuves concrètes à la théorie de l'évolution qui pourra enfin être acceptée par la communauté scientifique.

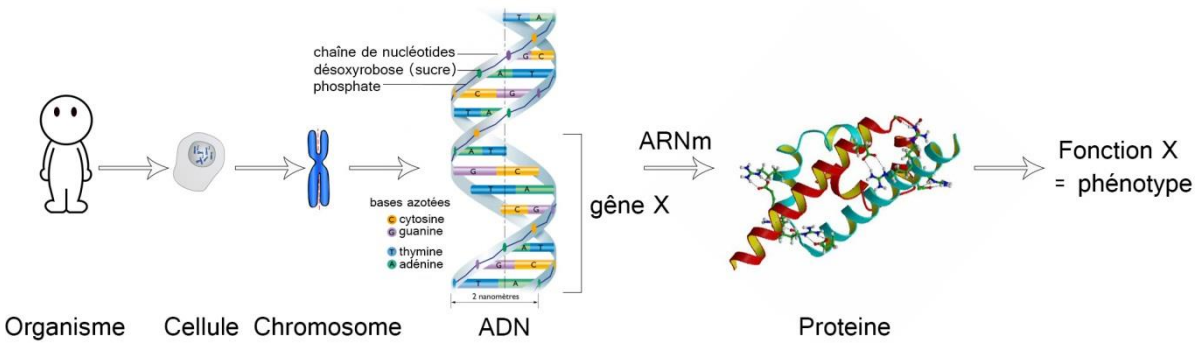


Figure 1 : Schéma explicatif des molécules impliquées dans le phénotype d'un individu.

Ce schéma montre que les protéines responsables du phénotype d'un organisme sont codées par l'ADN et synthétisées à l'aide de l'ARN messager (ARNm). L'ADN est condensé en chromosomes contenus dans le noyau des cellules de l'organisme.

b. Mutations génétiques motrices de diversité

Les recherches en génétique ont grandement permis de comprendre les mécanismes influençant l'évolution des espèces. Cependant, la naissance de la biologie moléculaire dans les années 70 avec les premières expériences de transfert de gènes et de clonage chez la bactérie *(Escherichia coli)* marquent le début concret de la génétique (Cohen et al., 1972). Cette discipline a permis de montrer que le génome accumule des **mutations** à chaque génération et que celles-ci ont une réelle importance pour la diversité phénotypique des espèces (Kimura, 1983), (Nei, 1987), (Sniegowski *et al.*, 1997).

Ces mutations sont le plus souvent **spontanées** et peuvent être d'origines diverses (Drake *et al.*, 1998), (Crow, 2000). Par exemple, elles peuvent être dues à un mauvais appariement des acides nucléiques qui constituent l'ADN, ceux-ci se forment normalement par paires (adénine + thymine et cytosine + guanine) (Fig.1). Les mutations génétiques peuvent être **ponctuelles** et ne toucher qu'une seule base nucléotidique, cependant ce changement peut éventuellement modifier des acides aminés et donc changer la fonction de la protéine (Nei, 1987), (Ng and Henikoff, 2003) . Enfin, des modifications génétiques peuvent également être dues à une **anomalie chromosomique**. Le nombre et l'arrangement des chromosomes peuvent en effet être modifiés (Charlesworth, 1991), (Lynch and Walsh, 2007).

Les mutations peuvent être **germinales** ou **somatiques**. Les mutations germinales sont présentes dans l'ADN des cellules souches d'un gamète alors que les mutations somatiques ne touchent pas les cellules destinées à la reproduction. Les mutations germinales peuvent donc être transmises à la descendance alors que les mutations somatiques ne sont jamais héréditaires (Suzuki and Griffiths, 1976). Dans le cas de **mutation héréditaire** la reproduction jouera un rôle clé dans la **transmission** de ces mutations à la descendance. Néanmoins, la transmission de ces mutations n'a pas toujours lieu. En effet, dans une population donnée, il est statistiquement inévitable que certains allèles ne soient pas transmis car certains individus n'ont pas réussi à se reproduire ou car leurs allèles sont trop peu représentés dans la population (Hartl *et al.*, 1997). De plus, d'autres éléments peuvent affecter le succès de transmission des mutations et leur maintien dans la population, comme la ségrégation chromosomique, le nombre d'individus de la population ou encore le ratio entre mâles et femelles (Hartl *et al.,* 1997).

Les mutations ont des conséquences directes sur le **phénotype** de chaque individu d'une population car le phénotype est sous le contrôle du **génotype** (Chanock *et al.,* 2007). Ces mutations peuvent donc parfois conduire à l'apparition de nouveaux caractères dans une population. Ainsi les mutations sont considérées comme un prérequis pour l'évolution d'une espèce (Hartl *et al.,* 1997). L'accumulation de mutations dans le génome des individus conduit donc à la diversité génétique mais aussi à la diversité phénotypique de la population (Losos, 2013). Ces mutations participent à la diversification des espèces et seulement celles qui sont favorables seront maintenues dans la population pour contribuer à leur évolution. Néanmoins nous devons bien comprendre que les mutations apparaissent aléatoirement (Remold and Lenski, 2001). Seuls certains mécanismes environnementaux peuvent influencer le maintien de ces modifications génétiques dans une population, l'un des principaux concepts qui tend à expliquer ce phénomène est la **sélection naturelle** (Darwin and Bynum, 2009).

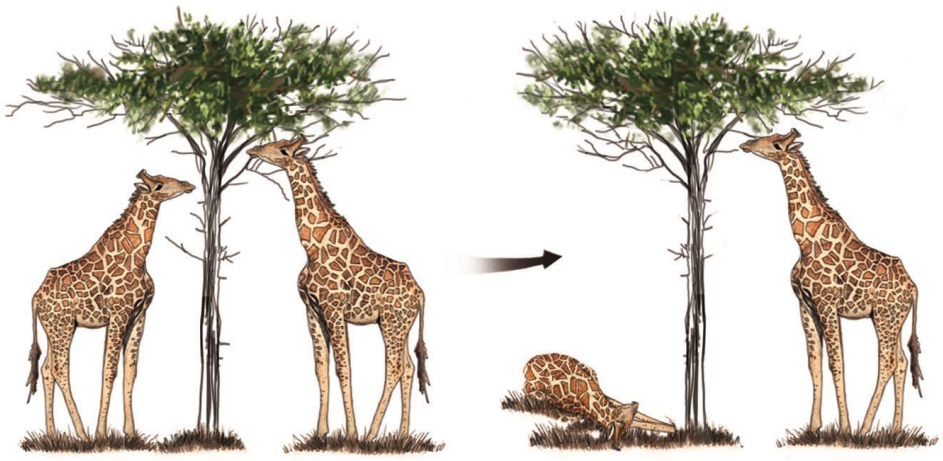


Figure 2 : Dessins présentant la sélection naturelle

Ce dessin représente deux girafes, l'une avec un cou allongé qui lui permet de manger les feuilles de l'arbre, l'autre avec un cou plus court ne pouvant pas se nourrir. Seules les girafes à long cou vont survivre car elles sont mieux adaptées à leur environnement.

c. La sélection naturelle

La **sélection naturelle** est l'un des phénomènes principaux expliquant la **diversité** des espèces telle que nous l'observons aujourd'hui (Darwin, 1859). Ce concept a été construit à l'aide des hypothèses émises par Darwin puis consolidé au fil des années grâce aux nombreuses découvertes de la communauté scientifique. Ce concept est aujourd'hui largement accepté et suivi par les évolutionnistes (Mousseau and Roff, 1987).

La sélection naturelle permet d'expliquer les effets de l'**environnement** sur les individus et sur leur évolution dans le temps (Fig.2). Naturellement dans une population les individus acquièrent des modifications phénotypiques, résultant de mutations accumulées dans son génome**.** Ces changements phénotypiques peuvent parfois leur apporter un avantage dans leur milieu naturel (Fig.2), (Darwin, 1859). Par exemple certains individus peuvent avoir une meilleure nutrition ou une meilleure condition physique. Cela leur apportera donc un avantage au niveau de leur survie, ce qui se traduira par une meilleure reproduction et finalement une meilleure descendance (ex : un plus grand nombre de descendants). On dit qu'ils ont un avantage sélectif (Darwin and Bynum, 2009).

Dans un second temps si ces nouveaux caractères (caractères dérivés) peuvent être transmis de façon héréditaire et que le milieu est favorable à ces nouveaux caractères, ils peuvent être maintenus et augmentés en fréquence dans la population. Ceci peut entrainer une fixation du caractère dans la population, signifiant que tous les individus de la population ont désormais ce caractère avantageux.

Un autre scénario possible est que le caractère dérivé soit aussi avantageux que le caractère ancestral (caractère déjà présent dans la population). Dans ce cas, les deux traits peuvent coexister dans la population. Les individus d'une même population présentent des phénotypes différents, on parle de **polymorphisme**. Cependant parfois les individus d'une population qui présentent le même phénotype peuvent se reproduire préférentiellement entre eux. Ceci peut alors créer un **isolement reproductif** entre les individus d'une même population. Ceci crée notamment une « barrière » dans le flux de gènes d'un individu à l'autres. Selon le principe évolutif, les mutations commencent alors à s'accumuler indépendamment entre les deux sous-populations. Au fil des générations cela entrainera une incapacité à se reproduire entre les individus présentant des phénotypes divergents. On obtient alors deux espèces distinctes, on parle dans ce cas de phénomène de **spéciation** (Weissing *et al.*, 2011).

Dans chacune des étapes conduisant à l'apparition ou la disparition d'une espèce, l'environnement joue un rôle clé. En effet si les nouveaux caractères qui apparaissent dans la population ne sont pas en adéquation avec le milieu de l'individu, ces caractères ne seront pas maintenus dans la population car ils sont désavantageux. L'**environnement** est donc indispensable pour la **sélection** des nouveaux traits morphologiques, qui sont adaptés à la condition du milieu des individus.
En conclusion, l'acquisition de nouveaux caractères qui sont par la suite sélectionnés par l'environnement est un processus clé de l'évolution des espèces. Néanmoins la plupart des traits qui semblent évoluer entre les espèces semble se former au cours du développement. Nous pouvons alors nous demander comment le développement des espèces peut conduire à tant de diversité phénotypique ?

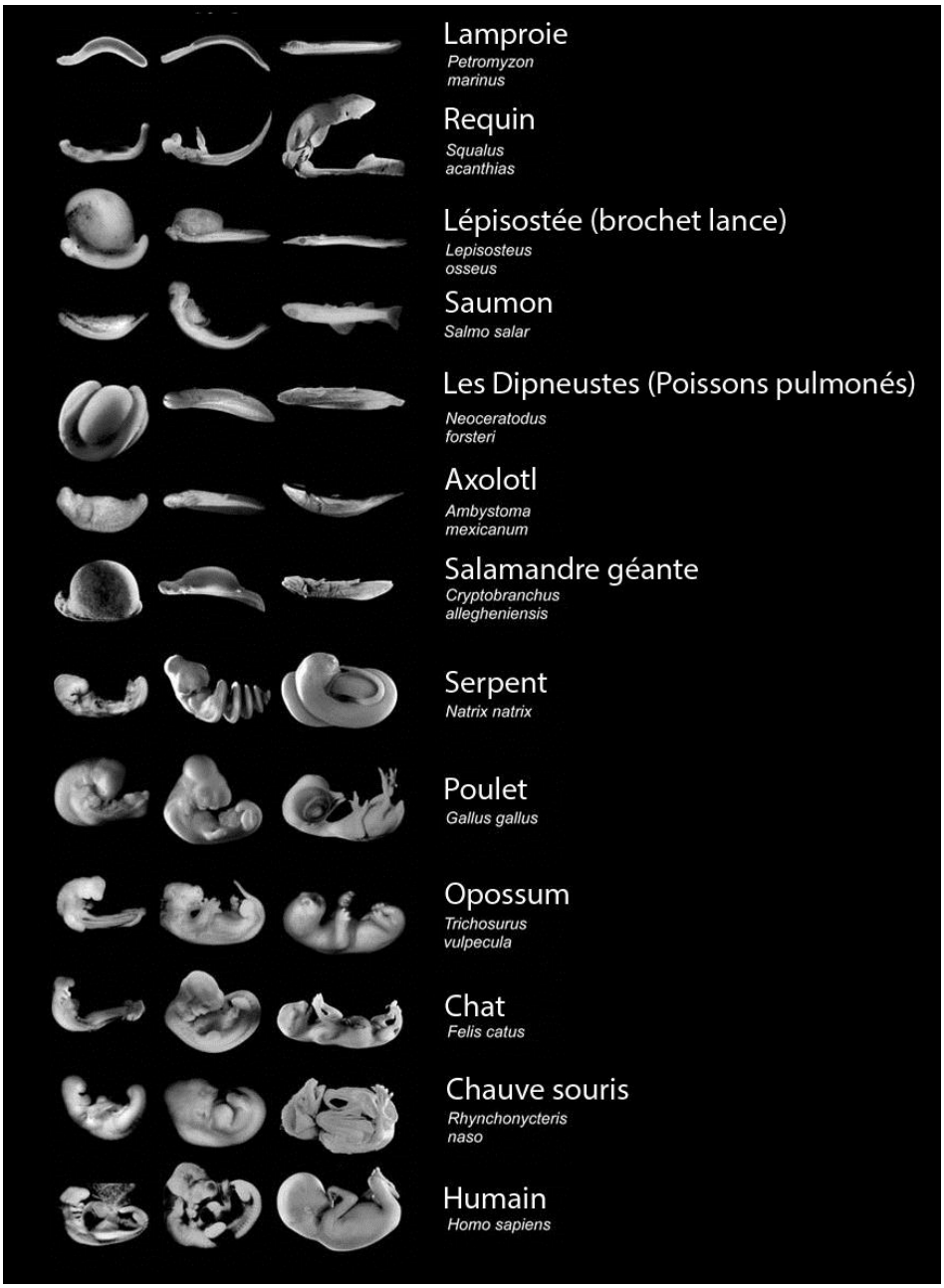


Figure 3 : Comparaison embryologique entre différentes espèces

Trois stades sont représentés du plus jeune au plus tardif (de gauche à droite), le premier après spécification de l'axe antéro-postérieur le second environ à la moitié de l'embryogénèse et le dernier à la fin de l'embryogénèse. Traduit à partir de (Richardson *et al.,* 1998).

2. Concept de l'Evo-Devo

Pour comprendre la diversité animale et l'évolution phénotypique, nous devons aussi comprendre comment ces traits sont générés. **Le développement** embryonnaire est un des processus fondamentaux durant lequel un organisme complexe se forme, et c'est pendant ce processus qu'une grande partie de la diversité est établie chez les individus (Lewis Wolpert, 2007).

Or, la comparaison du développement embryonnaire entre différentes espèces montre que celui-ci semble être assez conservé tout comme les gènes responsables de ce processus (Figs.3-4) (Richardson *et al.*, 1998).

D'autres études ont observé que certaines familles de gènes étaient présentes et très conservées entre différentes espèces. Comme par exemple l'étude des gènes *Hox* (Akam, 1989), (McGinnis *et al.,* 1984), (Krumlauf, 1994) qui sont impliqués dans le plan d'organisation des êtres vivants (Fig.4). Ils sont aussi appelés gènes architectes car ils codent pour l'emplacement des segments de l'axe antéro-postérieur et dorso-ventral de l'organisme. En d'autres termes l'expression des gènes *Hox* va permettre d'établir la position de chaque membre, organe et appendice (Swalla, 2006). Cette classe de gènes est l'une des premières à avoir été testée par transgénèse, mais surtout ces gènes sont très conservés et la comparaison des séquences des gènes Hox montre qu'ils sont présents chez la plupart des espèces avec des domaines homéotiques très proches (Swalla, 2006), (Fig.4).

D'autre part, si l'on compare les génomes de différentes espèces dans leurs globalités, ils peuvent également être très proches. Par exemple le génome de l'homme et du chimpanzé sont identiques à 99% (King and Wilson, 1975). Cela suggère que les changements dans le génome responsables de la diversité phénotypique entre ces deux espèces sont en quantité très faible car uniquement 1% du génome est différent entre celles-ci. Peu de changement génotypique peut donc conduire aux différences visibles entre deux espèces qui sont très différentes phénotypiquement.

Un paradoxe apparaît donc : si nos gènes sont si similaires, et donnent lieu aux mêmes processus développementaux, pourquoi sommes-nous différents ?

C'est alors qu'un nouveau concept a fait surface. Les fonctions des protéines ne dépendraient pas seulement de leur nature (conformation, structure…), et donc de la séquence codante des gènes. Certains chercheurs ont suggéré de considérer aussi le moment et l'endroit où les protéines sont synthétisées (Zuckerkandl and Pauling, 1965). Nous devons donc définir l'évolution des formes comme le résultat de modifications de l'expression spatiale et temporelle des protéines, et non plus seulement comme un changement de fonction protéique (Carroll, 2008).

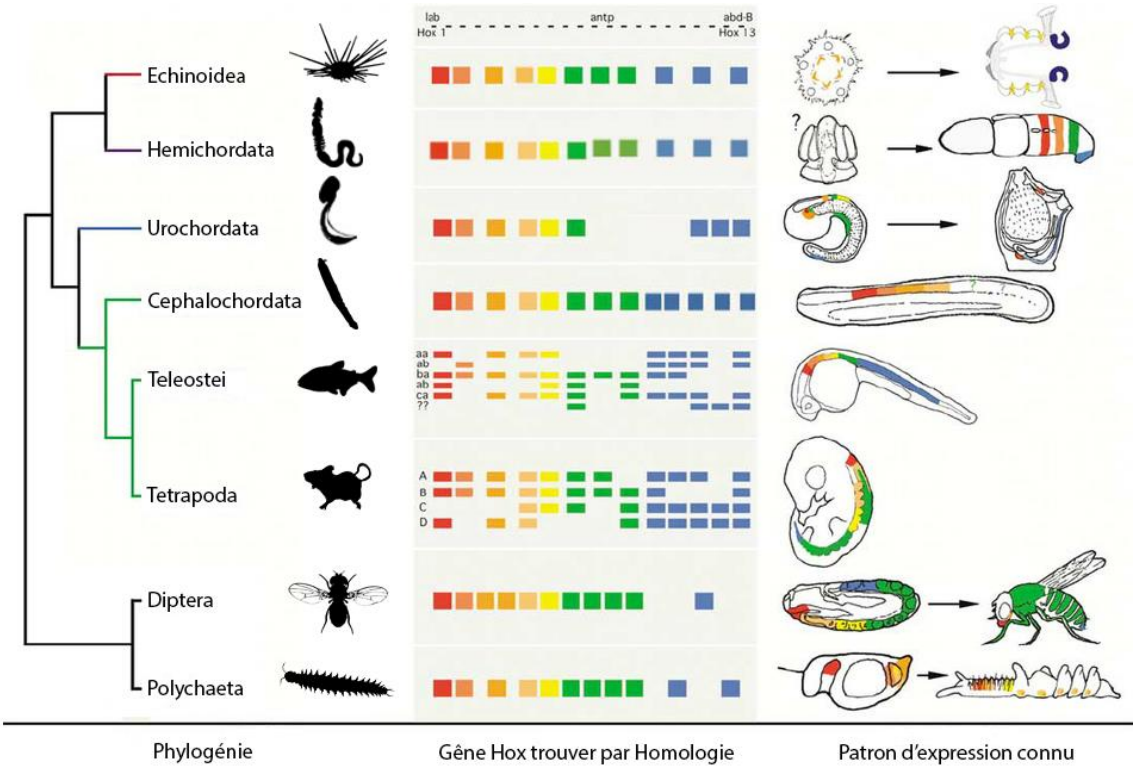


Figure 4 : Les gènes Hox, famille de gènes conservés entre différentes espèces

Présence des gènes Hox chez différentes espèces. Chaque gène Hox est représenté par un carré de couleur. On remarque que les gènes Hox sont dupliqués chez les vertébrés (Té*trapoda et Teleostei*) contrairement aux autres groupes, mais que la majorité des gènes Hox sont présents pour chaque espèce. Le patron d'expression connu est schématisé à droite de la figure. Adaptée à partir de (Swalla, 2006).

Pour comprendre l'évolution de la diversité des espèces nous devons donc prendre en compte ces deux aspects : l'évolution des séquences génétiques (ADN codant pour les protéines) et la façon dont les protéines sont exprimées au sein d'un organisme (régulation des gènes par l'ADN non codant) (Carroll, 2008).

Afin de déterminer comment l'évolution des morphologies participe à l'évolution des espèces, Sean Carroll suggère de prendre en compte trois paramètres : ce qui est possible fonctionnellement (effets des mutations), ce qui est probable (fréquences des différents types de mutations) et ce qui est permis par la nature (sélection naturelle) (Carroll, 2008).

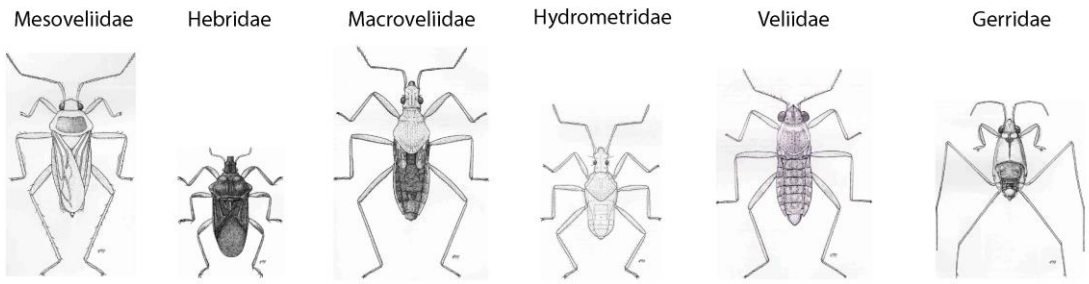


Figure 5 : Principaux groupes de Gerromorpha

Ces dessins ont été réalisés par Moller Andersen et représentent les principaux groupes de Gerromorpha. Adaptée à partir de (Andersen, 1982).

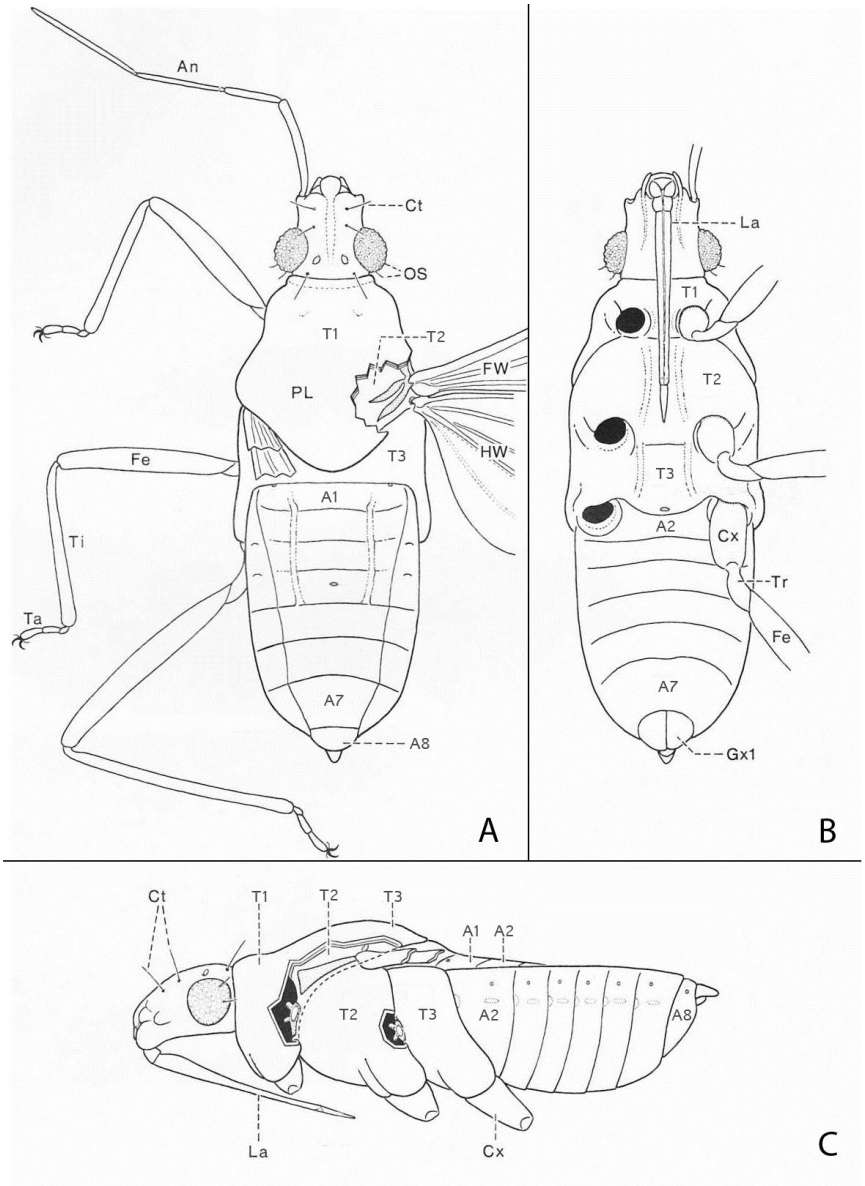


Figure 6 : Morphologie généralisée et simplifiée des Gerromorpha

A. Vue dorsale avec une partie du lobe du pronotum (PL : pronotonal lobe en anglais) enlevé pour montrer l'articulation de l'aile avant (FW : fore wing en anglais) et de l'aile arrière (HW : hind wing en anglais), sont visibles également les appendices avec les pattes et leurs segments : fémur (Fe), tibia (Ti) et tarsus (Ta) ainsi que l'antenne gauche (An) constituée de quatre segments. On distingue des poils sur la tête (Ct : trichobothria céphalique) vraisemblablement des poils sensoriels aussi visibles en vue latérale. Enfin on peut voir les yeux, aussi appelé sphères oculaires (OS : ocular setae en anglais) visibles également en vue ventrale et latérale.

B. Vue ventrale qui permet de visualiser l'articulation de la patte droite avec les coxa (Cx) et le trochanter (Tr), les

C. Vue latérale avec les antennes, les ailes et les pattes enlevées pour une meilleure visualisation des trois segments thoraciques (T1, T2, T3) et abdominaux (A1 à A8) aussi visibles pour la vue dorsale et ventrale. Adaptée à partir de (Andersen, 1982).

3. Objectif du laboratoire et modèle d'étude

Le laboratoire dans lequel j'ai effectué mon stage étudie la fonction des gènes au cours du développement, dans un contexte d'adaptation. Nous recherchons comment les mécanismes moléculaires et génétiques façonnent la morphologie en se basant sur des exemples d'adaptation. D'une manière générale, nous abordons des concepts liés à la sélection naturelle, la sélection sexuelle, l'adaptation à un nouvel environnement, et le développement.
Pour nos différents sujets d'étude nous utilisons les insectes semi-aquatiques (Gerromorpha) comme modèle d'étude. Les Gerromorpha sont connus pour avoir colonisé la surface aquatique il y a 200 millions d'années. Ils appartiennent à l'ordre des hémiptères, qui comprend environ 100 000 espèces d'insectes suceurs comme les punaises.

a. Ordre des Gerromorpha

Il existe huit familles au sein des Gerromorpha *:* Mesoveliidae*,* Hebridae*,* Macroveliidae*,* Hydrometridae*,* Paraphrynoveliidae, Veliidae*,* Gerridae et Hermatobatidae*.* Les principales familles sont représentées dans la Figure 5. Chacune de ces familles présente des morphologies, comportements, et/ou milieux naturels propres qui permettent de les différencier. Par exemple les Hermatobatidae sont retrouvés exclusivement dans les milieux marins, et les Gerridae présentent des corps et des pattes largement plus longs que les autres familles de Gerromorpha (Andersen, 1982), (Cheng *et al.,* 2001).

b. Caractère morphologique des Gerromorpha (Fig.6)

Les Gerromorpha possèdent en général de longs appendices adaptés à la locomotion en surface de l'eau ainsi que des pièces buccales avec un rostre alongé et articulé afin de se nourrir d'insectes tombés sur la surface de l'eau. Ils possèdent un pronotum (premier segment thoracique) épais qui protège les ailes qui peuvent être présentes ou non en fonction de l'environnement (Andersen, 1982).
Pour une des espèces les plus dérivées comme *Gigantometra gigas* (Gerridae) la troisième paire de pattes peut mesurer jusqu'à une dizaine de centimètres pour un corps d'environ trois centimètres (Tseng and Rowe, 1999).
Les pattes sont constituées de cinq segments proximo-distaux : le coxa, le trochanter, le fémur, le tibia et le tarse. Les antennes sont, elles constituées de quatre segments différents.

Le corps est composé d'un thorax et d'un abdomen segmentés (respectivement trois et huit segments) dont la forme est relativement allongée selon la famille.
La totalité du corps des Gerromorpha est recouverte de différents types de poils en densité très importante, ils permettent aux Gerromorpha d'être hydrophobes et donc de rester sec (Hu *et al.,* 2003), (Gao and Jiang, 2004).

Les femelles Gerromorpha possèdent un ovipositeur qui leur permet de déposer leurs œufs sur des débris flottants ou sur des plantes poussant sur la berge. Chez certaines espèces comme *Mesovelia mulsanti* (Mesoveliidae) on peut observer des ovipositeurs dérivés qui permettent aux femelles de pondre à l'intérieur de substrats relativement solides tels que des plantes (Jaczewski, 1930).

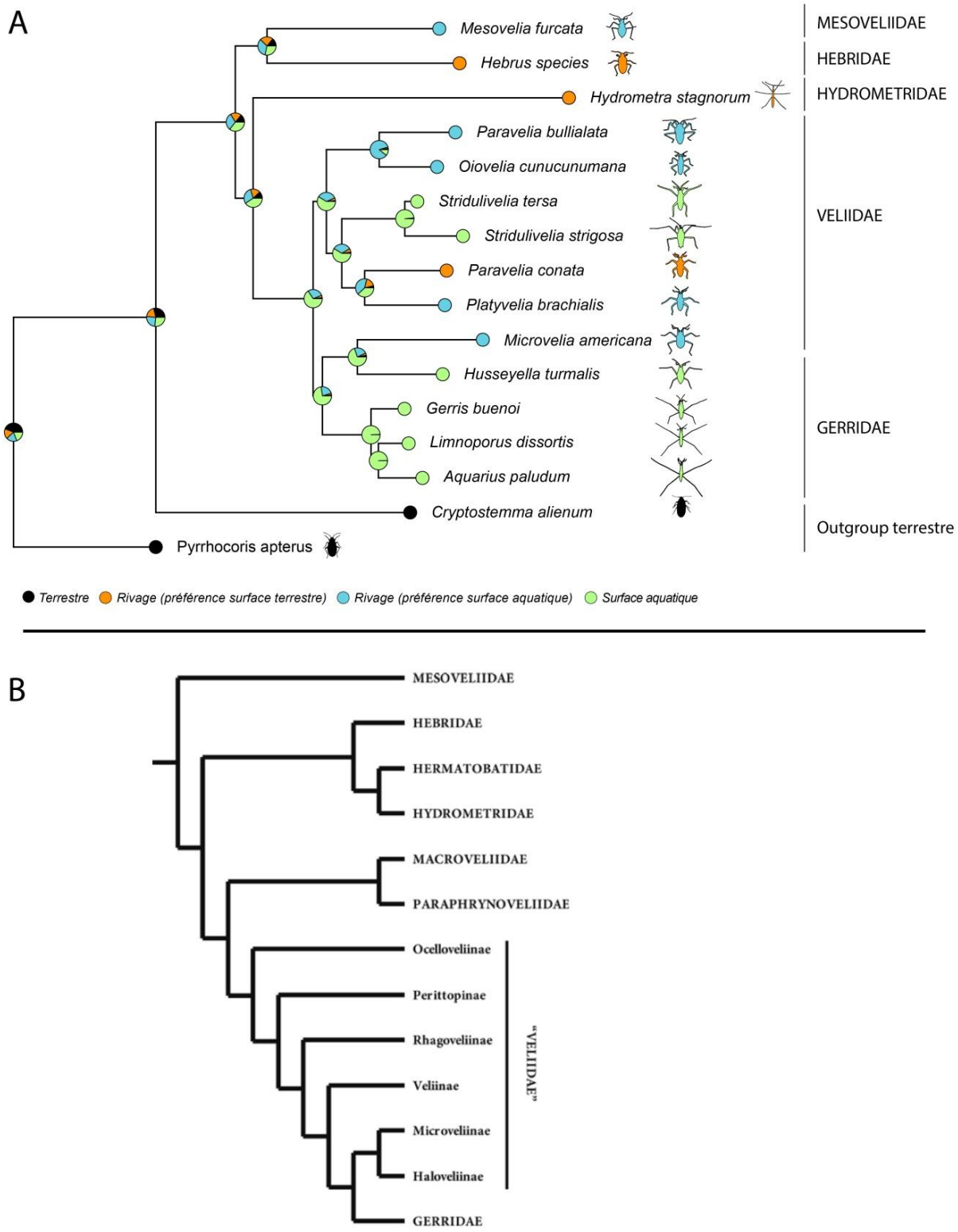


Figure 7 : Phylogénie des insectes semi-aquatiques

A. Phylogénie proposée en 2016 par *(Crumiere et al., 2016)* basée sur 14 marqueurs moléculaires. L'habitat des Gerromorpha est indiqué sur l'arbre phylogénétique *(Andersen, 1982).*

B. Phylogénie proposée par (Damgaard, 2008), basée sur 64 caractères morphologiques et les marqueurs moléculaires nucléaires 16S et 28S (Damgaard, 2008).

Les œufs sont parfois recouverts d'une substance gélatineuse qui semble les protéger, de plus ils sont adaptés aux milieux aqueux et sont le plus souvent en contact avec l'eau tout au long du développement (Cobben, 1968).

La durée de l'embryogenèse varie selon les espèces et la température, pour *Aquarius paludum* (Gerridae) il dure environ sept jours.
L'éclosion des œufs donne lieu au premier stade nymphal qui est morphologiquement quasiment identique au stade adulte. Cinq stades nymphaux se succèderont durant lesquels les individus vont grandir et muer (Andersen, 1982). La durée du développement post-embryonnaire dépend encore une fois des conditions du milieu comme la température, cependant il dure environ une vingtaine de jours pour *A. paludum* (Gerridae).

c. Phylogénie des Gerromorpha (Fig.7)

Tous les caractères morphologiques précédemment décrits ont permis de réaliser les premières phylogénies pour établir comment les espèces au sein du groupe des Gerromorpha seraient apparentées les unes aux autres. Andersen a proposé l'une des premières phylogénies des Gerromorpha (Andersen, 1982). Celle-ci a ensuite été affinée en 2008 par Damgaard (Fig.10-B) (Damgaard, 2008) en comparant la séquence des gènes ribosomiques 16S et 28S entre les espèces de Gerromorpha. Notre équipe a récemment proposé une autre phylogénie basée sur 14 marqueurs moléculaires (Fig.10-A) (Crumiere *et al.,* 2016). Ces deux phylogénies sont en globalité similaires, bien que certains embranchements diffèrent. Par exemple les Hebridae sont sur la même branche que les Hydrometridae pour la phylogénie de 2008 tandis qu'en 2016 les Hebridae sont sur la branche des Mesoveliidae. Cependant, ces deux phylogénies apportent une bonne idée de l'évolution des familles de Gerromorpha.

d. Niches environnementales et locomotion des Gerromorpha

Les niches environnementales des Gerromorpha sont très variées (Andersen, 1982), à savoir que certaines espèces peuvent vivre sur une toute petite surface aquatique comme des flaques (parfois temporaires) tandis que d'autres espèces se sont adaptées à des surfaces considérablement étendues tel que l'océan (Fig.10-A). Le type d'environnement des Gerromorpha est associé à deux modes distincts de locomotion (Andersen, 1976). Le premier très similaire aux espèces terrestres (type marcheur), est toujours associé à des milieux aquatiques proches du rivage ; tandis que les espèces qui possèdent un mode de locomotion dérivé (type rameur), vivent éloignées du rivage dans des milieux aquatiques ouverts tels que les rivières, les lacs, les mers…

e. Choix des Gerromorpha en tant que modèle d'étude

Les Gerromorpha présentent un intérêt considérable car leur morphologie est très diversifiée, en particulier au niveau des pattes. Cette biodiversité est un réel atout pour identifier les gènes responsables des changements morphologiques chez les insectes semi-aquatiques. Ce groupe d'espèces nous permet ainsi de comprendre comment l'environnement peut affecter la morphologie des individus car nous avons une bonne connaissance des pressions environnementales qui agissent sur eux.

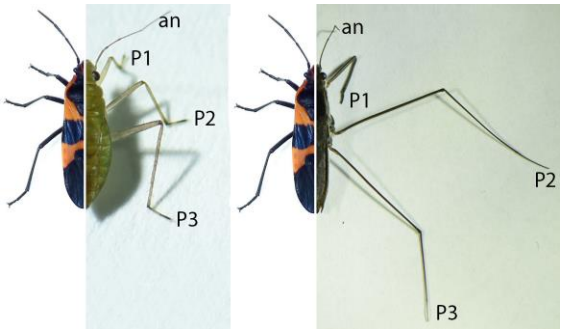


Figure 8 : Comparaison de la taille des pattes d'une espèce terrestre *O. fasciatus* avec deux espèces semi-aquatiques : *M. mulsanti* et *A. paludum*

Comparaison d'une espèce terrestre avec deux espèces d'insectes semi-aquatiques : à gauche *O. fasciatus* avec *M. mulsanti* (Mesoveliidae), à droite *O. fasciatus* avec *A. paludum* (Gerridae).

Source photo Oncopeltus: Copyright © 2013 Iustin Cret.

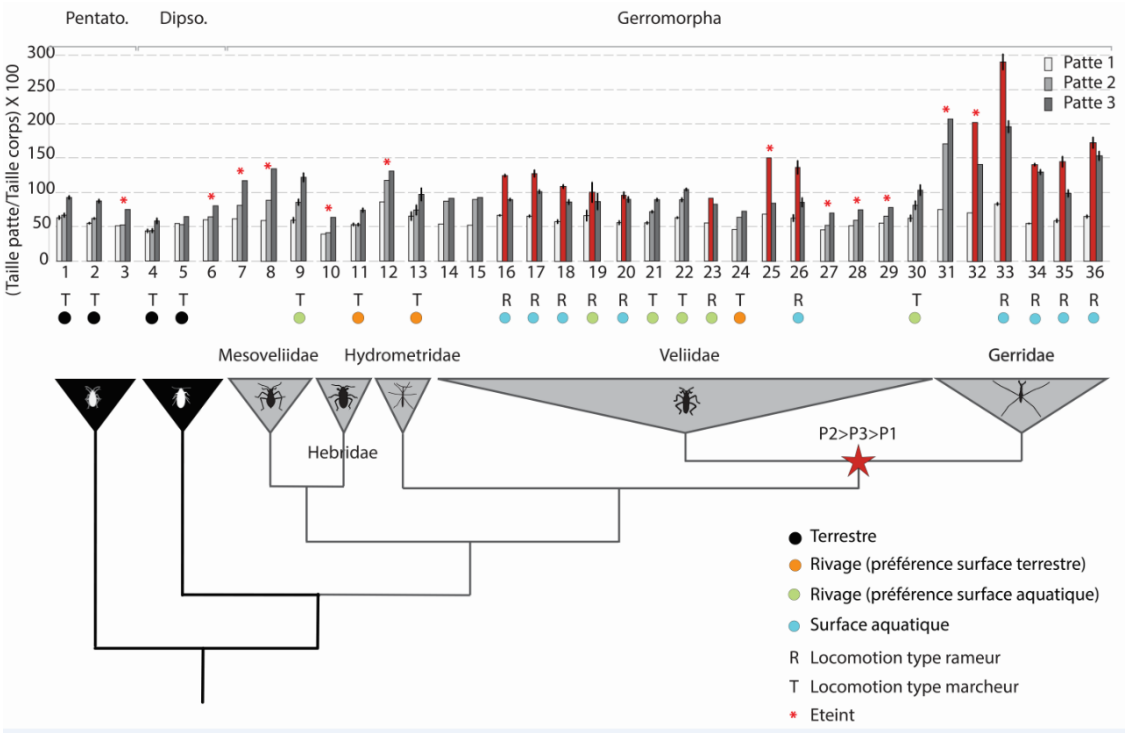


Figure 9 : Phylogénie des insectes semi-aquatiques en considérant la taille des pattes

Phylogénie des insectes semi-aquatiques et longueur des pattes sur la longueur du corps à travers un échantillon d'espèces d'Hétéroptères existantes et éteintes. En rouge on remarque les espèces possédant un nouveau plan d'organisation des pattes (P2>P3>P1), dans les triangles on a présenté un exemple de la morphologie d'une espèce représentative du groupe affilié. Adaptée à partir de (Crumiere *et al.,* 2016).

Abréviation : Pentato: Pentatomomorpha; Dipso: Dipsocoromorpha; *[1] Pyrrhocoris apterus; [2] Oncopeltus fasciatus ; [3] Yuripopovina magnifica; [4] Cryptostemma alienum; [5] Hypsipteryx vasarhelyii; [6] Libanohypselosoma popovi; [7] Sinovelia mega; [8] Mesovelia dominicana; [9] Mesovelia furcata; [10] Miohebrus anderseni; [11] Hebrus species; [12] Cretaceometra brasiliensis; [13] Hydrometra stagnorum; [14] Perittopus borneensis; [15] Perittopus asiaticus; [16] Rhagovelia obesa; [17] Stridulivelia strigose; [18] Stridulivelia tersa; [19] Platyvelia brachialis; [20] Velia caprai; [21] Oiovelia cunucunumana; [22] Paravelia bullialata; [23] Paravelia bipunctata; [24] Paravelia conata; [25] Halovelia electrodominica; [26] Husseyella turmalis; [27] Microvelia electra; [28] Microvelia grimaldii; [29] Microvelia polhemi; [30] Microvelia americana; [31] Cretogerris albianus; [32] Electrobates spinipes; [33] Metrobates hesperius; [34] Limnoporus dissortis; [35] Gerris buenoi; [36] Aquarius paludum*

4. Exemples d'évolutions et d'adaptations

Nous avons montré précédemment les concepts conduisant à l'évolution des espèces. Ici nous présenterons deux exemples d'évolution d'espèces, le premier exemple présentant l'évolution de la taille des pattes des Gerromorpha et dans le second exemple nous expliquerons l'évolution de la segmentation des insectes.

a. Adaptation des Gerromorpha à la surface aquatique

L'adaptation des Gerromorpha à la surface aquatique constitue un aspect central de l'histoire évolutive de cette famille d'insectes. Cette adaptation s'est accompagnée d'un nombre très important de modifications morphologiques qui constituent la richesse de ce groupe d'insectes (Andersen, 1976), (Andersen, 1982), (Crumiere *et al.,* 2016). Dans notre étude, nous nous sommes focalisés sur un caractère morphologique qui leur a permis de coloniser la surface de l'eau : la taille relative des pattes.

❖ Evolution de la taille des pattes des Gerromorpha

Lorsque l'on observe les Gerromorpha dans leurs milieux naturels, l'un des traits phénotypiques le plus marquant est leur incroyable longueur de pattes. Si l'on compare cette taille relative de pattes pour une même taille de corps à une espèce apparentée mais qui est exclusivement terrestre, *Oncopeltus fasciatus*, on remarque que l'espèce terrestre possède des pattes beaucoup plus courtes que celles des Gerridae ou des Mesoveliidae (Figs.8-9).

La quantification de la taille des pattes en normalisant les mesures par la taille du corps montre qu'à l'unique exception des Hebridae, les Mesoveliidae, les Hydrometridae, les Veliidae et les Gerridae présentent des longueurs de pattes supérieures à celles des six espèces terrestres étudiées (Fig.9).

Malgré cette différence de taille de pattes, certaines espèces, telles que les Mesoveliidae présentent un plan d'organisation des pattes similaire à celui des insectes terrestres, c'est-à-dire la première paire de pattes est plus courte que la deuxième paire de pattes, elle-même plus courte que la troisième paire de pattes (P1<P2<P3) (Matsuda, 1960), (Andersen, 1976), (Figs.8-9).
Ce plan d'organisation des pattes, associé à une augmentation générale de la taille des pattes, leur a permis de marcher sur les surfaces aquatiques proches du rivage, tout en conservant un mode de locomotion similaire à celui des espèces terrestres (Fig.9).

Chez les espèces plus dérivées dans la phylogénie des insectes semi-aquatiques, nous observons d'autres changements morphologiques. En effet les Gerridae par exemple présentent un nouveau plan d'organisation des pattes avec la seconde paire de pattes plus longue que la troisième (P2>P3>P1) (Figs.8-9) (Matsuda, 1960), (Fairbairn, 1992), (Klingenberg and Zimmermann, 1992).
Ce changement morphologique associé à une importante croissance des pattes, leur a permis de coloniser des surfaces aquatiques plus vastes (lacs, océans, ruisseaux…) et de s'adapter à l'aide d'un nouveau mode de locomotion en ramant avec la deuxième paire de pattes et en se stabilisant avec la première et la troisième (Fig.9) (Andersen, 1976), (Andersen, 1982).

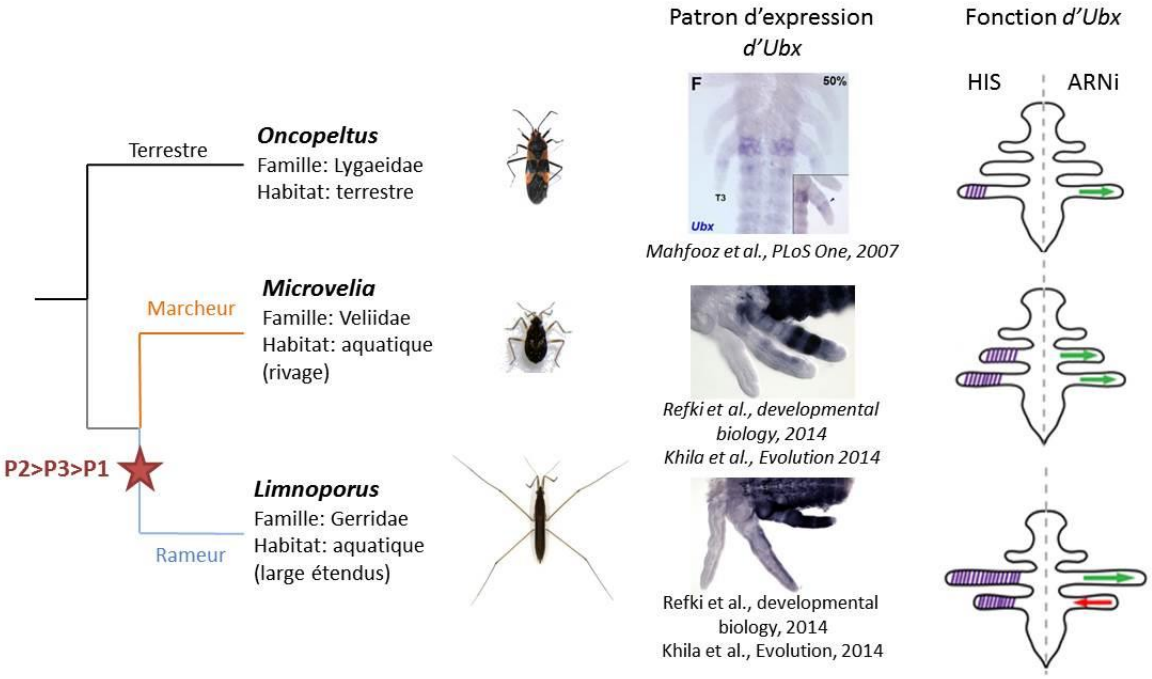


Figure 10 : Schéma récapitulatif du patron d'expression et de la fonction d'*Ubx*

Représentation simplifiée de la phylogénie avec une espèce terrestre proche des Gerromorpha : *Oncopeltus,* deux espèces de Gerromorpha avec des plans d'organisation des pattes différents, sont représentées. Pour chacune de ces espèces l'expression et la fonction du gène *Ultrabithorax* (*Ubx*) sont représentées.

❖ Ultrabithorax associé à l'évolution de la taille des pattes des Gerromorpha

L'expression des gènes *Hox* est responsable de l'identité cellulaire le long de l'axe antéro-postérieur, et le troisième segment thoracique est sous le contrôle du gène *Ubx*. Chez les insectes, *Ubx* est en général exprimé dans le troisième segment thoracique ainsi que dans la troisième paire de pattes (Mahfooz *et al.,* 2007), (Stern, 2003).
Un changement d'expression *d'Ubx* peut provoquer des changements morphologiques très sévères avec par exemple l'apparition d'une seconde paire d'ailes sur le troisième segment thoracique, ce changement est appelé changement homéotique (Wagner, 2007).
L'équipe d'Abderrahman Khila a récemment démontré que les changements de longueur des pattes sont associés à des changements d'expression et de fonction du gène Hox *Ultrabithorax (Ubx)*. Ce gène développemental, en plus de ses fonctions, est impliqué dans l'évolution de la taille des pattes des Gerridae (Khila *et al.,* 2009) (Fig.10).

Chez les espèces de Gerromorpha proches des espèces terrestres, ayant un plan d'organisation ancestral, telles que les Mesoveliidae ou les Veliidae, le profil d'expression *d'Ubx* se situe non seulement dans le troisième segment thoracique et la troisième paire de pattes mais également dans le second segment thoracique et la seconde paire de pattes (Fig.10).
L'étude de la fonction *d'Ubx* grâce à la diminution de son expression par l'ARN interférent (ARNi) a conduit au raccourcissement de la seconde et troisième paire de pattes comparées aux embryons sauvages (Refki et al., 2014). Ceci suggère que le nouveau domaine d'expression *d'Ubx* a permis une élongation de la seconde et troisième paire de pattes pour les Veliidae et les Mesoveliidae.

Chez les Gerridae, le marquage *d'Ubx* par hybridation in-situ sur des embryons a montré que ce gène est exprimé de la même manière que chez les Mesoveliidae. Cependant, l'expression *d'Ubx* est environ 6 à 7 fois plus forte dans la troisième paire de pattes par rapport à la seconde (données obtenues à partir du transcriptome). Ce changement dans l'intensité de l'expression *d'Ubx* suggère une différence de fonction entre les deux pattes et les deux espèces (Refki *et al.,* 2014).
Chez les Gerridae, l'ARNi d'*Ubx* a provoqué la diminution de la seconde paire de pattes mais une augmentation de la troisième paire de pattes. Cette fonction diffère des Mesoveliidae où l'absence *d'Ubx* provoque le raccourcissement de la seconde et troisième paire de pattes (Khila *et al.,* 2009), (Refki *et al.,* 2014).

Il a également été démontré que cet effet observé dans la troisième paire de pattes est dépendant de la dose *d'Ubx*. En effet lorsqu'*Ubx* est fortement diminué par l'ARNi, son effet sur la troisième paire de pattes est plus faible. Une inversion est même détectée dans le cas d'une injection d'une très forte concentration d'ARN double brin (ARNdb). Cette « sensibilité » d'*Ubx* observée lors de l'ARNi peut expliquer comment *Ubx* induit la diminution de la taille de la troisième paire de pattes chez les Gerridae contrairement aux Mesoveliidae (Refki *et al.,* 2014).

D'autre part, le gain d'expression d'*Ubx* dans la seconde paire de pattes, que ce soit chez les Mesovellidae ou les Gerridae, a probablement évolué par l'intermédiaire d'un ou plusieurs régulateurs en amont du gène *Ubx*. En effet, la seconde paire de pattes a pu acquérir l'expression d'un ou plusieurs facteurs de transcription qui peuvent soit promouvoir l'activation *d'Ubx* soit atténuer la répression d'*Ubx* dans cette paire de pattes.

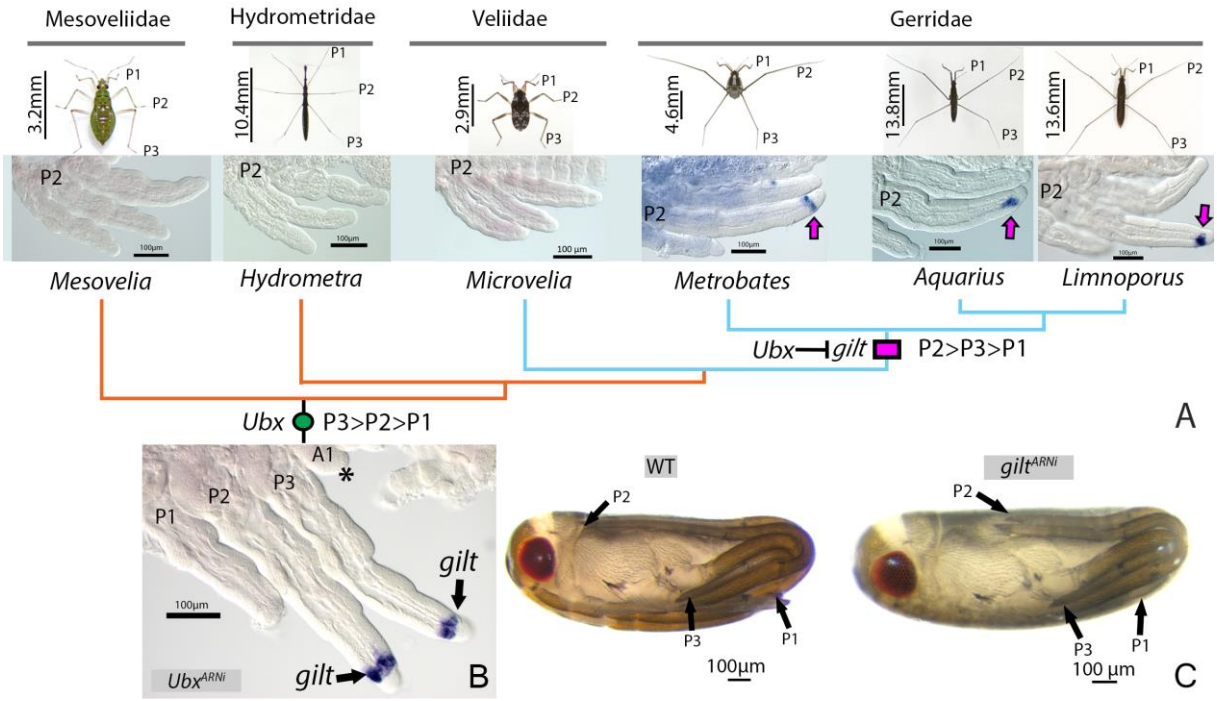


Figure 11 : Schéma récapitulatif du patron d'expression et de la fonction de *gilt* chez les Gerromorpha.

(A) Représentation simplifiée de la phylogénie des GerromorphaPour chaque famille, l'expression de *gilt* est représentée grâce à des marquages sur embryons par hybridation *in situ*. (B) Expression de gilt par hybridation *in-situ* sur un embryon de Gerridae ARNi pour Ubx. Une étoile représente la patte ectopique d'UbxARNi. (C) Comparaison d'un embryon de Gerridae Wild Type avec un embryon de Gerridae ayant subi l'ARN interférent de gilt. Adaptée de (Armisén *et al.,* 2015).

Pour la nouvelle fonction d'Ubx dans la troisième paire de pattes chez les Gerridae par rapport aux Mesoveliidae, de nouveaux gènes cibles d'*Ubx* ont pu intervenir dans le but de réprimer l'élongation de celle-ci (Fig.10).

❖ *gilt* impliqué dans l'élongation de la seconde et troisième paires de patte des Gerridae.

À l'aide de comparaisons transcriptomiques de l'expression des gènes présents dans la seconde et troisième paires de pattes des Gerridae, un autre gène a été mis en évidence pour une fonction de croissance des pattes. Il s'agit du gène *gamma-interferon-inducible lysosomal thiol reductase:* g*ilt* (Armisén *et al.,* 2015).

Le gène *gilt* est très fortement exprimé dans la seconde paire de pattes contrairement à la troisième où il est très peu exprimé. Ceci a été confirmé par hybridation insitu, puis la fonction de ce gène a été testée à l'aide d'ARNi (Fig.11).

Les phénotypes observés sur les embryons $gilt^{ARNi}$ ont montré que *gilt* a pour fonction d'allonger essentiellement la patte deux et légèrement la patte trois (Fig.11-C). Une hybridation *in-situ* du gène *gilt* sur des embryons ayant subi l'interférence à l'ARN pour *Ubx*, a révélé une nouvelle expression très forte dans la troisième paire de pattes. Ce résultat suggère que le facteur de transcription *Ubx* réprime l'expression du gène *gilt,* diminuant de ce fait la longueur de la troisième paire de pattes (Fig.11-B).

Enfin il a été démontré que *gilt* n'est présent que chez les Gerridae. L'expression de ce gène est donc associée aux familles de Gerromorpha présentant des pattes très dérivées morphologiquement comparées aux espèces terrestres (Fig.11-A).

Pour finir l'évolution de *gilt* coïncide avec l'évolution du plan d'organisation des pattes qui ont permis à ces familles de s'adapter dans les zones aquatiques étendues ce qui suggère que *gilt* est probablement associé au changement de plan d'organisation des pattes observé chez les Gerridae.

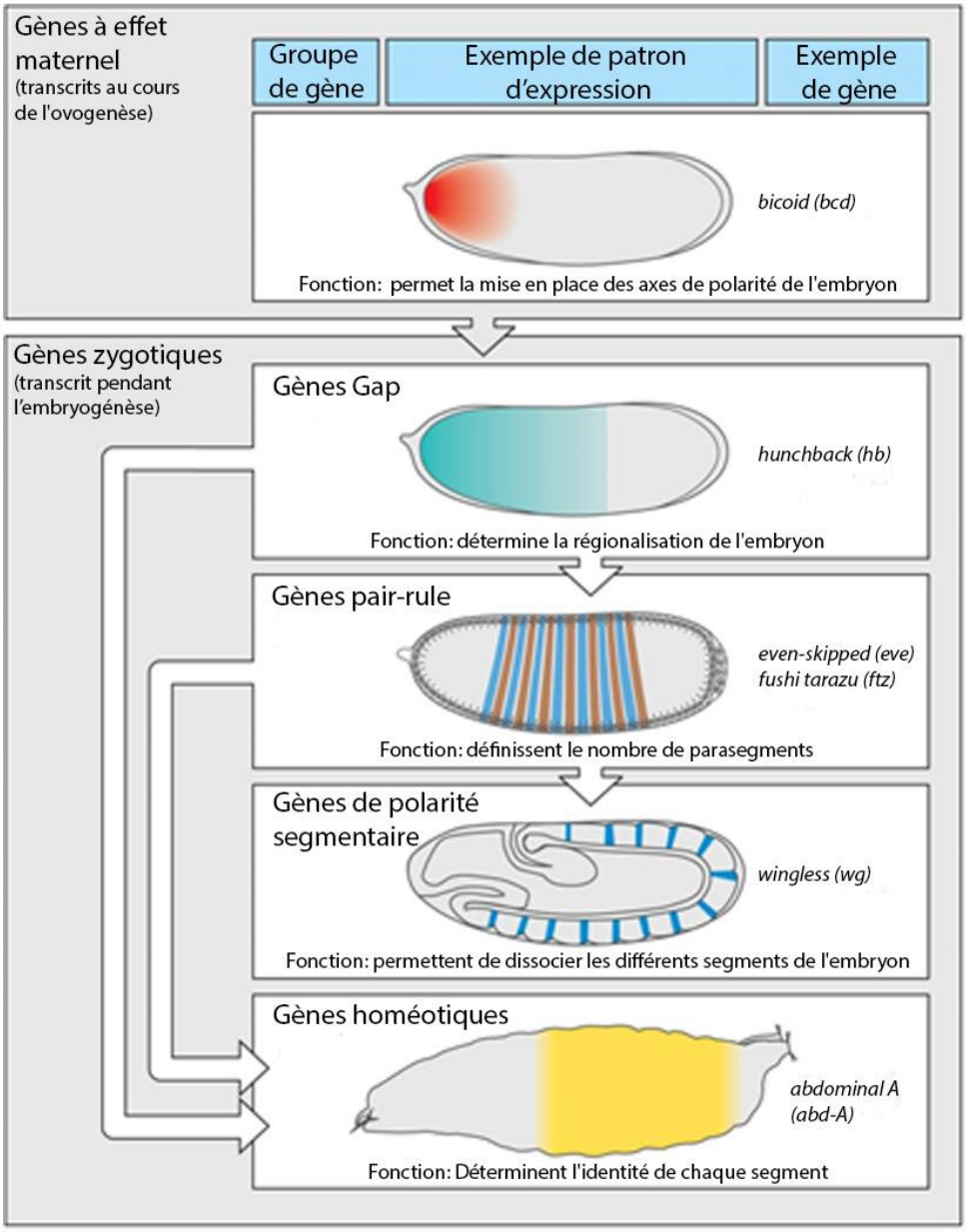


Figure 12 : Gènes impliqués dans la segmentation chez la Drosophile

Figure représentant les gènes impliqués dans le mécanisme de segmentation de l'embryon de Drosophile. Chaque régulation de gène est représentée par une flèche. Plusieurs classes de gènes sont nécessaires pour segmenter l'embryon de la Drosophile. La première classe à être exprimée comprend les gènes à effet maternel comme *bicoid (bcd),* ils vont réguler les gènes gap comme *hunchback (hb),* qui vont eux même réguler les gènes pair-rule comme *even-skipped (eve)* ou *fushi tarazu (ftz)* qui eux régulent les gènes de polarité segmentaire comme *wingless (wg).* Enfin interviendra à la fin de la segmentation les gènes homéotiques comme *abdominal A (abd-A)* qui sont régulés par l'intermédiaire des gènes gap et pair-rule. Adaptée à partir de (Lewis, 1978).

b. Evolution de la segmentation chez les insectes

Le développement des insectes, notamment la Drosophile (Diptera), a été établi depuis de nombreuses années. Les gènes qui interagissent lors de la segmentation de l'embryon de Drosophile sont bien connus (Lewis, 1978).
Chez la Drosophile, la polarité est établie par l'ARN messager (ARNm) provenant de gènes transmis par la mère : **gènes à effet maternel**. Les protéines résultant de la traduction de ces ARNm vont activer ou réprimer les gènes le long de l'axe antéro postérieur de l'embryon. Ces gènes sont appelés **gènes gap**, ils codent pour des facteurs de transcription qui régulent les gènes **pair-rule** qui vont diviser l'embryon en 14 parasegments. Enfin, les protéines pair-rule régulent les **gènes de polarité des segments** et **les gènes homéotiques** qui déterminent le développement de chaque segment.

Durant des années, la recherche a suivi ce modèle de segmentation car les gènes impliqués dans la segmentation présentent des homologues chez tous les insectes (à quelques exceptions près). Cependant, l'étude du développement d'autres espèces d'insectes a montré des différences avec la Drosophile, notamment au niveau de l'expression des gènes de segmentation. La réévaluation du mécanisme de segmentation en comparant le développement de l'embryon entre différents insectes a mis en évidence **deux modes de segmentation distincts** (Hughes and Kaufman, 2002), (Liu and Kaufman, 2005b), (Davis and Patel, 1999).

Le premier mode, déjà connu chez la Drosophile, a été défini comme segmentation « long germ band » (bande germinale longue) car les segments de l'embryon de Drosophile sont spécifiés au même moment (Fig.12).
Le second mode décrit le mode de segmentation appelé « short germ band » (bande germinale courte), présent chez des espèces comme *Oncopeltus* (Hemiptera) *ou Tribolium* (Coleoptera). Contrairement au mode de segmentation précédent, celui-ci se distingue par un mode de segmentation graduelle ou les segments de l'embryon sont spécifiés successivement à partir du côté postérieur de l'embryon au niveau de la « zone de croissance » (Fig.12).

Pour comprendre la différence entre ces deux modes de segmentation, les chercheurs ont comparé l'expression et la fonction des gènes impliqués dans la formation des segments (Fig.12).
Ils ont tout d'abord vérifié la conservation de ces gènes connus chez la Drosophile pour les espèces qui présentaient le mode de segmentation short germ band comme *Oncopeltus* et *Tribolium* (Liu and Kaufman, 2005a), (Rosenberg *et al.,* 2009).
Ils ont montré que l'un des gènes de la Drosophile ne présentait aucun homologue chez les autres insectes : il s'agit de *Bicoid (bcd)* (Stauber et al., 1999), (Stauber et al., 2000). Ce gène est exprimé antérieurement chez la Drosophile et permet l'activation des gènes *orthodenticle (otd)* et *hunchback (hb)* dans le but de former la tête et le thorax, et la répression du gène *caudal* (exprimé postérieurement) (Berleth *et al.,* 1988).
Pour *Tribolium,* une espèce présentant un mode short germ band, *bcd* semble être substitué par *otd* et *hb* qui présentent, tout comme *bcd,* une expression antérieure et des fonctions similaires (Schroder, 2003).

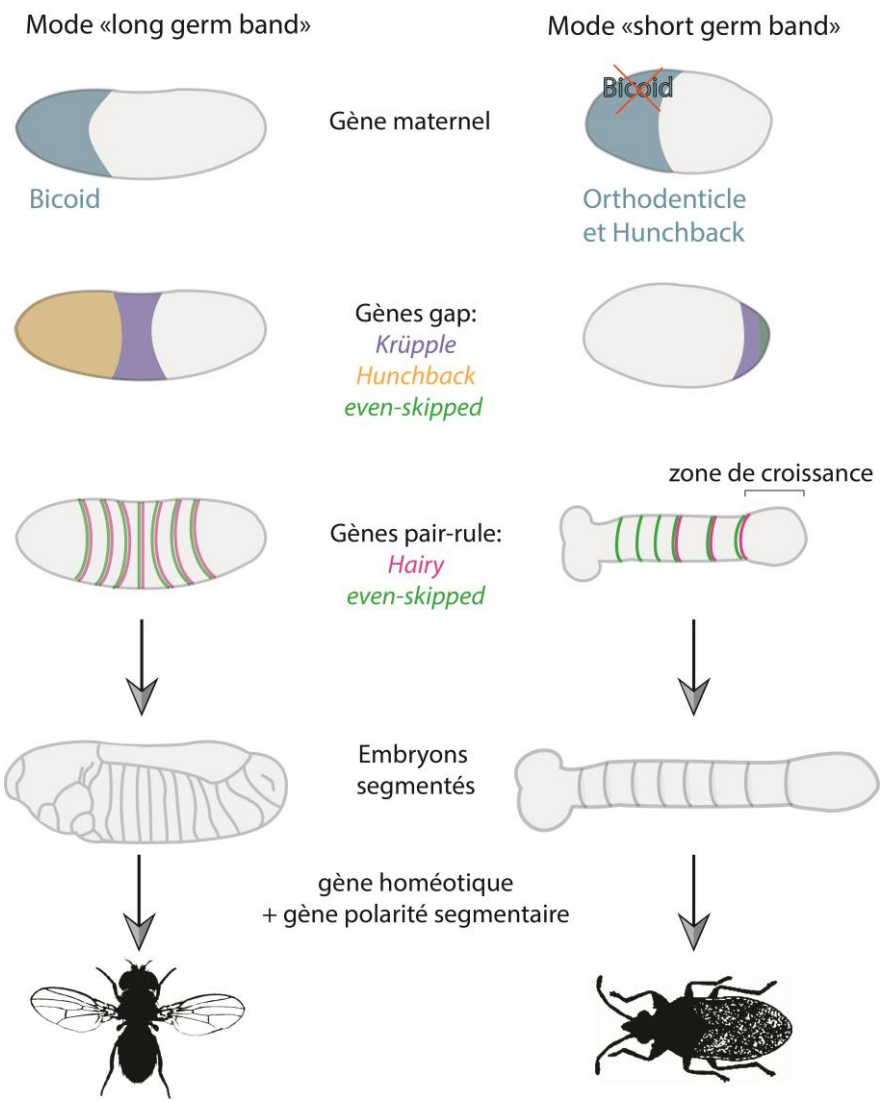


Figure 13 : Exemple de différences d'expression des gènes impliqués dans la segmentation entre une espèce long-germ band et short germ band

Représentation des différences d'expression pour des gènes impliqués précocément dans le processus de segmentation : les gènes maternels, les gènes gap, les gènes pair-rule qui conduisent à la formation d'un embryon segmenté. À gauche, l'expression des gènes segmentaires pour *Drosophila* qui possède un mode de segmentation short germ band et à droite pour *Oncopeltus* qui possède un mode de segmentation long germ band.

Cependant l'activation de *hb* par *bcd* est l'un des évènements clé dans la spécification de l'axe antéro-postérieur chez la drosophile alors comment la spécification antéro-postérieure a-t-elle lieu chez *Tribolium* ? De plus, sans homologue de *bcd,* comment le domaine d'expression de *hb* apparait ? Certains papiers proposent que ce serait un gène exprimé postérieurement qui activerait *hb* à la place de *Bicoid* cependant aucune évidence pour l'instant n'a été apportée pour déterminer de quel gène il s'agissait (Schulz *et al.,* 1998), (Wolff *et al.,* 1998).

D'autres gènes présentent également des divergences : les gènes pair-rule, malgré leur conservation, montrent des expressions différentes entre les deux modes de segmentation. Par exemple *even skipped (eve),* connu pour sa fonction de gène pair-rule chez la drosophile avec un domaine d'expression en bande le long de l'embryon*,* (Nüsslein-Volhard *et al.,* 1985), (Figs.12-13), est exprimé de la même manière qu'un gène gap chez *Oncopeltus* avec une fonction postérieure très importante contrairement à la Drosophile (Liu and Kaufman, 2005b), (Liu and Kaufman, 2005a). C'est le cas pour beaucoup d'autres gènes comme *krüppel* (gène gap) et *hairy* (gène pair-rule) (Liu and Kaufman, 2005b), de manière générale les gènes ayant une fonction pair-rule montrent souvent une fonction gap chez les espèces possédant un mode de segmentation short germ band (Fig.13).

Le changement d'expression et de fonction des gènes gap et pair-rule et la présence de *Bicoid* (gène maternel) chez la Drosophile a donc pu jouer un rôle clé dans l'évolution de la segmentation et donc dans la morphologie de la Drosophile.

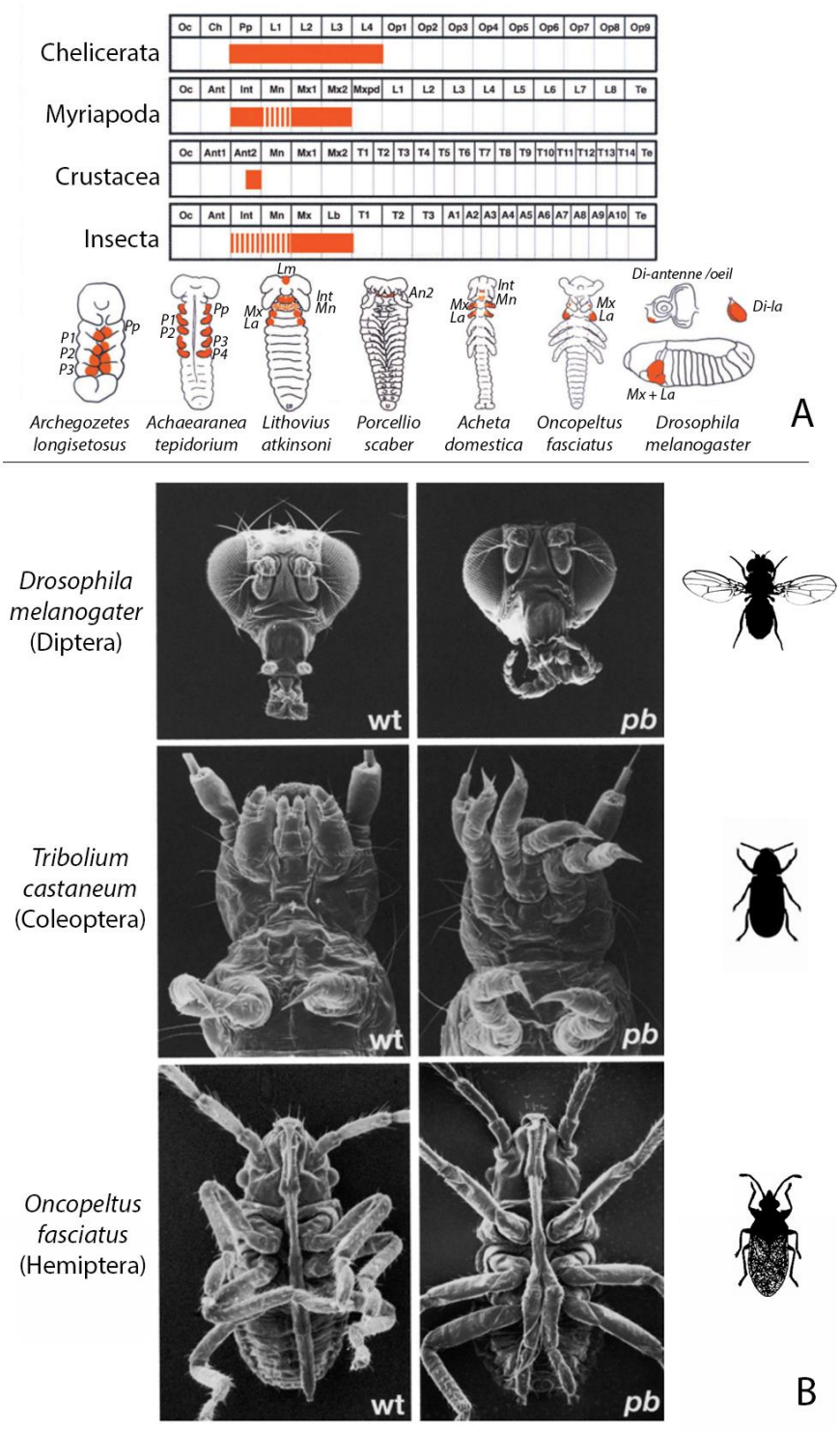


Figure 14 : Différences d'expression et de fonction du gène *Hox proboscipedia* entre différentes espèces d'Arthropodes et d'insectes

Représentation schématique de l'expression de *proboscipedia* (*pb*) chez quatres classes d'Arthropoda: Chelicerata, Myriapoda, Crustacea et Insecta (A). Fonction de pb pour trois espèces d'insectes : *Drosophila, Tribolium* et *Oncopeltus* (B). Adaptée à partir de (Hughes and Kaufman, 2002).

Abréviations : Pp : pedipalp (seconde paire d'appendices des Arachnides) ; An : antenne ; P1, P2, P3, P4 : patte 1, 2, 3 , 4 ; Lm : labrum , Int : Intercalaire ; Mn : mandibule ; Mx : maxillaire ; La : labium, Di : disque imaginal.

L'expression des gènes *Hox* a également largement évoluée chez les insectes, ceux-ci sont essentiels à la morphologie des segments. Une revue regroupe la plupart des différences d'expression de ces gènes au sein des arthropodes (Fig.14) (Hughes and Kaufman, 2002). Cette étude montre que malgré la présence d'homologues chez la plupart des espèces, leurs domaines d'expression ainsi que leurs fonctions montrent des divergences.

Par exemple la comparaison du gène *Hox proboscipedia (pb)* entre la Drosophile, *Tribolium* et *Oncopeltus,* trois espèces appartenant à l'embranchement des insectes, a montré que les modifications homéotiques engendrées par l'absence de *pb* ne sont pas exactement identiques (Fig.14-B), (Hughes and Kaufman, 2002).
Chez le mutant *pb* de la Drosophile, le labium (pièce buccale) est transformé en patte et les maxillaires sont modifiés. Pour *Tribolium,* l'absence de *pb* entraine la transformation du labium et des maxillaires en pattes (Fig.14-B). Enfin pour *Oncopeltus,* uniquement la partie distale du labium est transformée en patte alors que les maxillaires sont inchangés.

Ces différences de transformation sont associées avec des différences d'expression de *pb. S*i l'on compare l'expression de *pb d'Oncopeltus* et de *Drosophila*, on remarque qu'elle est très faible et limitée à un petit patch dorsal dans les maxillaires d'*Oncopeltus* alors qu'elle est dans la totalité des segments maxillaires de la Drosophile. Ceci peut expliquer l'absence de modification des maxillaires chez *Oncopeltus* contrairement à la Drosophile (fig.14-A).

Enfin si l'on regarde l'expression de *pb* pour les autres classes d'Arthropoda avec les Chelicerata, et Crustacea on remarque un domaine d'expression dans des segments associés à des structures autres que les pièces buccales. Par exemple pour *Archegozetes longisetosus* (Arachnida : Chelicerata) l'expression de *pb* est présente également dans les pattes (Hughes and Kaufman, 2002).

L'ancêtre des Arthropodes avait donc probablement un domaine d'expression de *pb* non restreint au segment formant les pièces buccales, comme celui des Chelicerates (Fig.14-A), qui est devenu un peu restreint pour les autres classes d'Arthropodes comme les Hemiptères avec *Oncopeltus.*
Le domaine d'expression flexible de ce gène peut avoir été critique pour la diversification des appendices buccaux des Arthropodes. Notamment pour *Oncopeltus* qui possède un long labium spécifique des insectes piqueurs-suceurs qui permet d'aspirer les substances nutritives contenues dans les plantes ou les proies (Hughes and Kaufman, 2002).

L'ensemble de ces données suggère que non seulement les changements d'expression des gènes *Hox* participeraient à des différences de phénotype entre les insectes mais aussi à des échelles plus grandes comme celle des Arthropodes*.*
Le mode de segmentation dérivé de la Drosophile et le changement d'expression de gènes impliqués dans la morphologie comme les gène *Hox* nous montrent que le développement de la Drosophile est permis grâce à la réutilisation d'un réseau de gènes essentiels dans la segmentation qui a pu conduire à la diversification des Insectes et même des Arthropodes*.*

II. Objectif du projet d'étude

Nous avons montré que l'adaptation des Gerromorpha à la surface aquatique s'est accompagnée de diverses modifications morphologiques. Le but de la première partie de mon projet d'étude est de comprendre comment ces morphologies sont apparues. Plus précisément : Quels sont les gènes impliqués dans l'élongation différentielle des pattes des Gerridae en se concentrant sur une espèce représentative : *Aquarius paludum ?* (Fig.15-18)

La seconde partie de mon mémoire est consacrée à la comparaison de la fonction et de l'expression d'un réseau de gènes entre différents Arthropodes. Ma contribution au projet est de tester la fonction et l'expression de trois gènes distincts chez *Gerris buenoi* (Gerridae).
Ce projet permettra de comprendre comment la fonction des réseaux d'interactions géniques évolue à une échelle plus grande que celle des Gerromorpha.

Ce second projet a été réalisé en collaboration avec trois autres équipes de recherche :

- L'expérimentation et la supervision des données *d'Oncopeltus fasciatus et de Nasonia vitripennis* ont été réalisées par Miriam Rosenberg.
- L'expérimentation sur *Tribolium castaneum* a été réalisée par Suparna Ray sous la supervision de Martin Klingler.
- L'expérimentation sur *Drosophila melanogaster* a été réalisée par Hélène Chanut sous la supervision de François Payre.

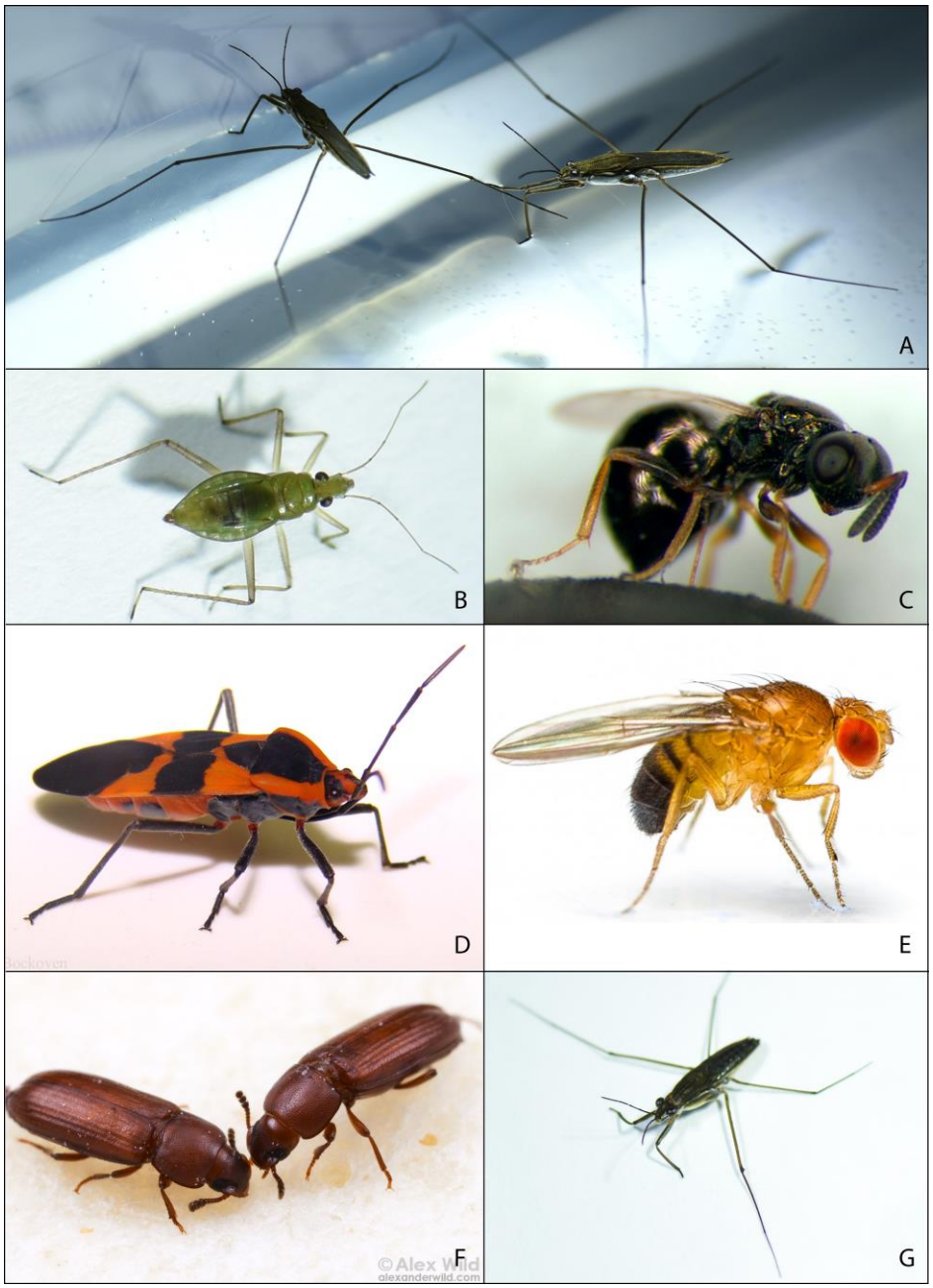


Figure 15 : Espèces modèles utilisées pour l'étude

Photos représentant les espèces utilisées dans les deux projets d'études réalisés. Photos de *Gerromorpha* (A, B et G) avec respectivement l'espèce *A. paludum* (*Gerridae*), à gauche un mâle, et à droite une femelle ; *M. mulsanti* (*Mesoveliidae*), et *G. buenoi (Gerridae)*. Egalement présentes, une photo de *N. vitripennis (Hymenoptera)* (C), *d'O. fasciatus (Hemiptera)* (D)*, de D. melanogaster (Diptera)* (E) et de *T. castaneum (Coleoptera)* (F).

Adresse source des photos :
Nasonia: https://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/1/10/Nasoniavit.jpg
Oncopeltus: https://6legs2many.files.wordpress.com/2011/01/lygaeidae_oncopeltus_fasciatus_female_milkweed_bug.jpg
Drosophila: https://www.yourgenome.org/sites/default/files/styles/banner/public/banners/stories/fruit-flies-in-the-laboratory/single-fruit-fly-drosophila-melanogaster-on-white-background-cropped.jpg?itok=TAQXNXmm
Tribolium: https://photos.smugmug.com/Insects/Stories/Household-Pests/i-VgNqZZr/2/eeb340c7/XL/Tribolium1-XL.jpg

III. Matériel & méthode

a. Liste des espèces utilisées

Projet A : Adaptation des Gerridae à la surface aquatique

- *Aquarius paludum* de la famille des Gerridae (Fig.15-A), collecté sur le plan d'eau des Saloniques, Villette d'Anthon, France.
- *Mesovelia mulsanti* de la famille des Mesovellidae (Fig.15-B), collecté au Canada.

Projet B : Fonction et expression des gènes *svb, pri* et *Ubr3*

- *Nasonia vitripennis (Hymenoptera)* (Fig.15-C).
- *Oncopeltus fasciatus (Hemiptera)* (Fig.15-D).
- *Drosophila melanogaster (Diptera)* (Fig.15-E).
- *Tribolium castaneum (Coleoptera)* (Fig.15-F).
- *Gerris buenoi (Hemiptera)* (Fig.15-G).

b. Elevage des insectes semi-aquatiques

Chaque espèce d'insectes semi-aquatiques est élevée dans des aquariums en verre ou des bacs en plastiques à 25°C avec un cycle de lumière alternant 14h de jour et 10h de nuit. L'humidité de la pièce est maintenue à 55%. Les Gerromorpha sont nourris avec des grillons frais ou décongelés et nous utilisons des morceaux de polystyrène comme flotteurs pour que les femelles puissent pondre leurs œufs.

c. Transcriptome

Pour répondre à notre problématique, nous avons utilisé un transcriptome précédemment généré dans le laboratoire (Armisén *et al.,* 2015), d'une espèce de la famille des Gerridae présentant un plan d'organisation des pattes dérivé : *Limnoporus dissortis*. Les niveaux de transcription ont été évalués en calculant le nombre de séquences d'ARN réparties par fragments (reads) par Kilobase par Million (RPKM) dans chaque échantillon.

d. Clonage des gènes candidats

❖ Extraction d'ARN

Nous avons tout d'abord réalisé une extraction d'ARN totaux (Annexe 1) à partir d'embryons et de nymphes *d'A. paludum,* une espèce très proche et présentant le même plan d'organisation des pattes que *L. dissortis* mais plus accessible (habitat : France).

❖ Synthèse d'ADN complémentaire et amplification du gène d'intérêt

L'ARN est transcrit en ADN complémentaire par transcription inverse et amplifié par réaction en chaîne par polymérase (PCR) grâce à des amorces spécifiques préalablement désignées (Annexe 2-3).

❖ Clonage (Annexes 4 à 8)

Chaque gène est cloné dans un plasmide pGEMT (Annexes 4-5) au niveau du MCS (site de clonage multiple) à l'aide d'une ligation (Annexe 4). Ce plasmide contient les promoteurs T7 et SP6 qui permettent de synthétiser des sondes et des ARN double brin.
Ces plasmides sont ensuite transformés dans des bactéries DH5 alpha (Annexe 6) afin de sélectionner les plasmides recombinants (Annexe 7) et ensuite d'amplifier le plasmide (Annexe 8).

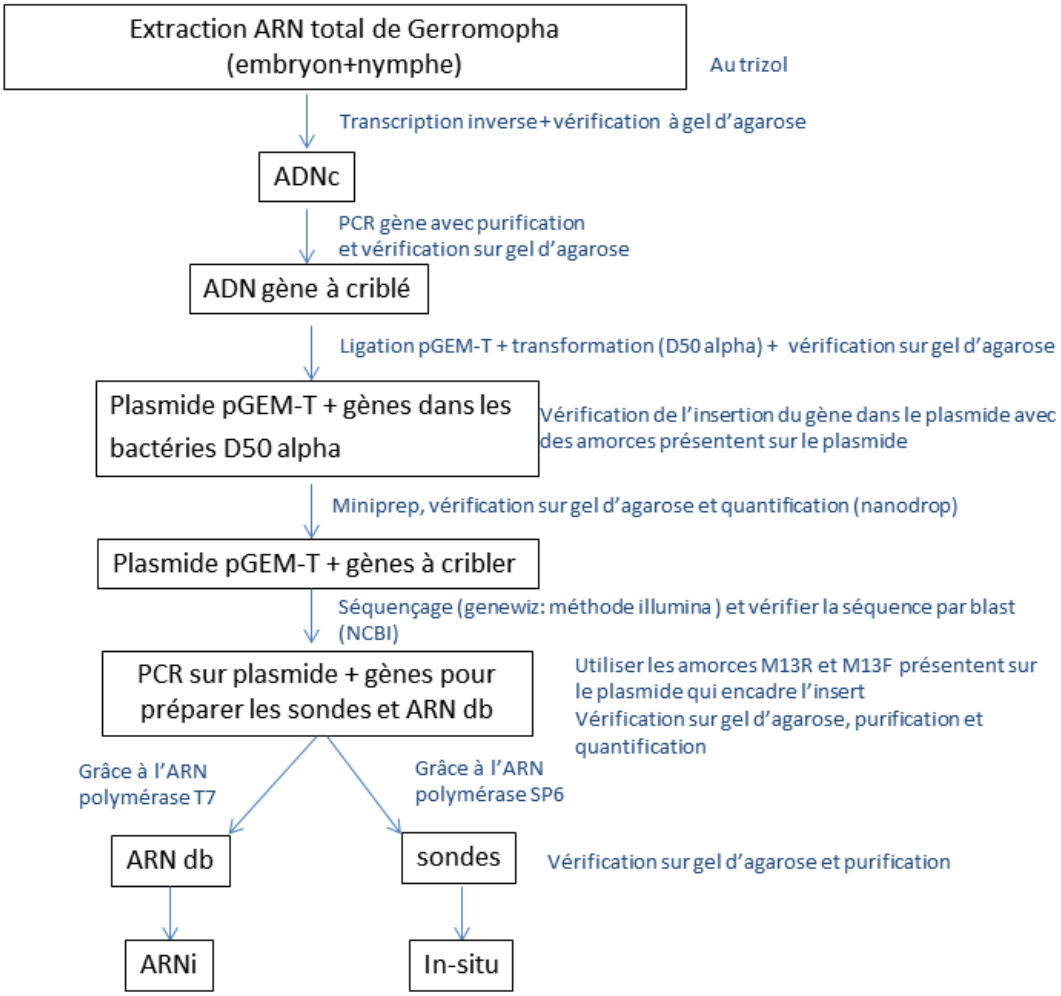


Figure 16 : Organigramme des étapes de biologie moléculaire du projet d'étude

Organigramme des manipulations de biologie moléculaire pour réaliser les sondes et le double brin pour tester l'expression et la fonction d'un gène. En noir chaque étape de biologie moléculaire, en bleu les expérimentations associées.

e. Séquençage

Les plasmides ayant bien inséré le gène d'intérêt sont envoyés dans une compagnie de séquençage (Genewiz) afin de vérifier que l'insert correspond bien au gène candidat sélectionné (Annexe 7). L'identification des gènes est ensuite vérifiée par blast puis à l'aide d'une phylogénie (Annexes 13 à 16).

f. Sondes et hybridations in-situ

À partir de ces plasmides, des sondes sont synthétisées à l'aide de la polymérase SP6 qui reconnait un promoteur SP6 situé sur le plasmide (Annexe 9). Ces sondes nous permettent de révéler le patron d'expression des gènes d'intérêt par hybridation *in situ* (HIS) selon le protocole établi en 2014 par l'équipe (Refki *et al.,* 2014), (Annexe 10). Les hybridations in-situ sont réalisées sur plusieurs stades embryonnaires afin de pouvoir visualiser l'expression des gènes durant le développement.

g. ARN double brin

Dans le cas où les gènes montrent un patron d'expression dans les pattes, l'ARN double brin (ARNdb) est synthétisé à partir du plasmide (transcription avec T7 polymérase) (Annexe 11). Par ARN interférence, l'expression du gène d'intérêt est diminuée et la fonction du gène au cours de l'embryogenèse est ainsi déterminée.

h. Injection de l'ARN double brin

Les injections sont réalisées au niveau de l'appareil reproducteur des femelles *A. paludum* adultes, l'ARNdb diffuse au niveau des organes génitaux, ce qui impacte le développement des embryons. Les malformations éventuelles sont donc observées chez leurs progénitures (Refki and Khila, 2015).

i. Mesures et photos des embryons ARNi

Le nombre d'embryons utilisés pour les mesures est de dix minimums. Les mesures sont réalisées à la fin de l'embryogénèse, juste avant l'éclosion. Pour cela, les embryons sont disséqués pour chaque ARNi ainsi que des embryons sauvages pour la comparaison des mesures (Annexe 18).
Les embryons sont montés dans une solution de Hoyer's. Afin de normaliser la taille des pattes, l'œuf est mesuré comme étant la substitution de la taille du corps sur les embryons avant la dissection (Annexes 19-20). Les mesures et photos ont été réalisées et enregistrées sur un microscope Zeiss à l'aide du logiciel Zen.

j. Analyses statistiques

Pour toutes les conditions, les données n'étaient pas significativement différentes d'une distribution normale (Tab.9). Les différences significatives dans les longueurs des pattes et segments ont été déterminées en utilisant des tests statistiques ANCOVA avec la taille du corps en tant que cofacteur (Tab.11 à 14).

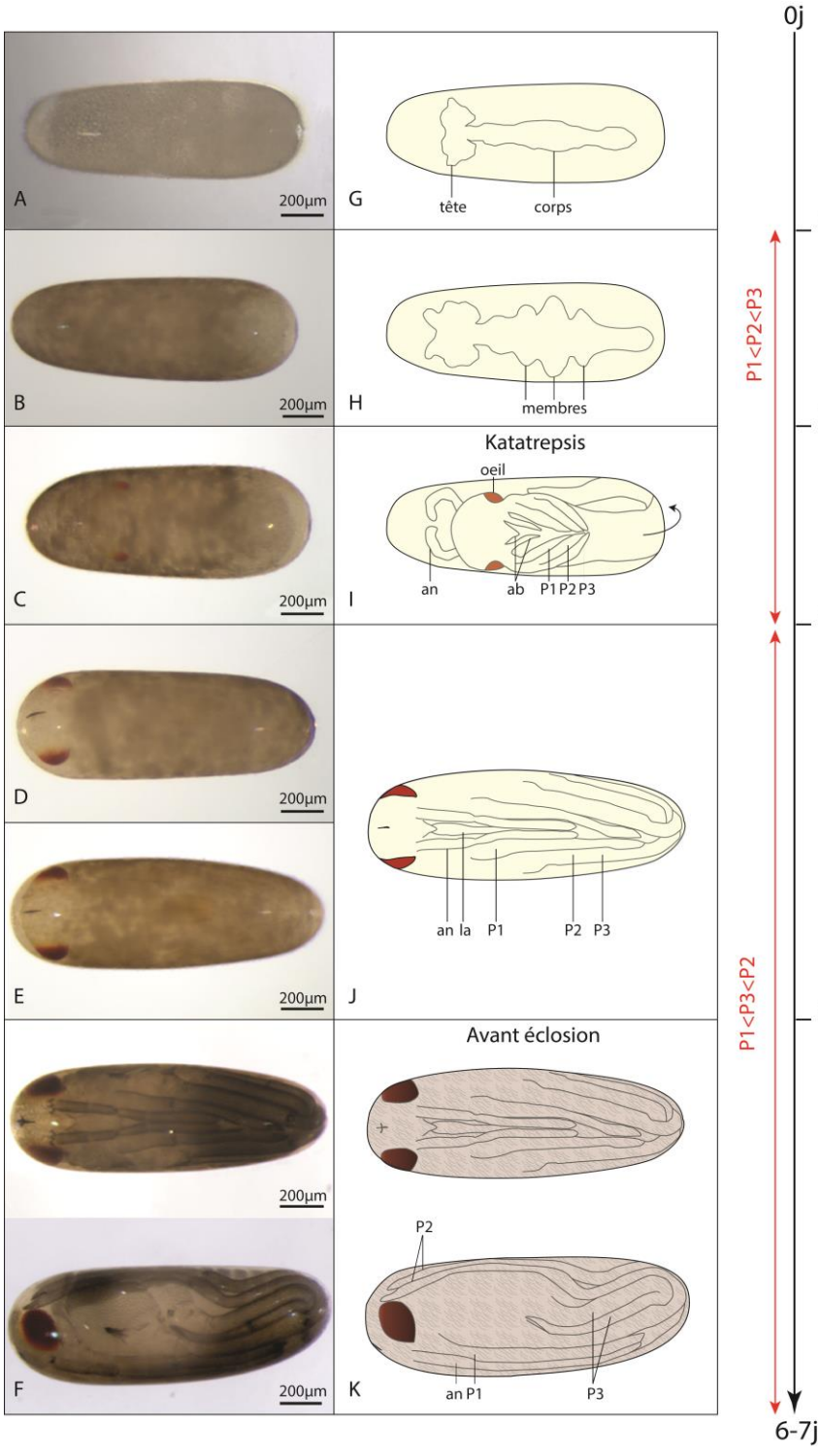


Figure 17 : Développement embryonnaire *d'A. paludum*

Photos (A à F) et dessins (G à K) représentant le développement *d'A. paludum* (Gerridae). Au cours des trois premiers jours du développement (A, B, C et G, H, I) la tête, le corps, les appendices et les yeux sont formés.

La durée du développement est représentée par une flèche ainsi que le changement de plan d'organisation des pattes.

Au cours du second jour (B-H) l'embryon présente toujours le plan d'organisation ancestral avec la première patte plus courte que la seconde elle-même plus courte que la troisième. C'est aussi pendant cette période que l'embryon subit une rotation dans l'œuf pour passer d'un pôle à l'autre : cette étape se nomme katatrepsis.

À partir du troisième jour (D, E et J) la plupart des structures morphologiques de l'embryon sont formées, la croissance des pattes est déjà importante et la seconde paire de pattes devient plus longue que la troisième. Les deux derniers jours du développement (F-K) permettront à l'embryon de totalement se former avec les appendices buccaux (ab), les poils, les yeux, la croissance des appendices…

IV. Résultats

Chapitre A : Adaptation des Gerridae à la surface aquatique

1. Introduction

L'équipe a montré que l'augmentation générale de la taille des pattes a été critique afin que les Gerromorpha s'adaptent à la surface aquatique et colonisent de nouvelles niches tel que l'océan (Khila *et al.,* 2009), (Refki *et al.,* 2014), (Armisén *et al.,* 2015), (Crumiere *et al.,* 2016). Mon sujet d'EPHE portait sur l'étude d'une nouvelle liste de gènes candidats afin de compléter les connaissances déjà apportées dans les études précédentes. Cela nous permettra de mieux comprendre les mécanismes développementaux et génétiques qui ont parmi l'évolution phénotypique des pattes des Gerridae.

2. Résultats

a. Etablissement de la liste des gènes candidats

Afin de comprendre quels sont les gènes impliqués dans l'augmentation générale de la taille des pattes chez les Gerridae, nous avons comparé l'expression des gènes chez *L. dissortis* (Gerridae) entre les pattes.

Nous avons dans un premier temps comparé les gènes exprimés entre la seconde et troisième patte, car la seconde paire de patte montre la croissance la plus importante chez les Gerridae. L'étude du développement des Gerridae a permis de mettre en évidence une croissance inégale dès l'embryogenèse (Fig.17), l'étude des gènes exprimés durant l'embryogenèse devrait donc nous permettre de mettre en évidence des gènes différentiellement exprimés expliquant cette croissance différentielle des pattes (Khila *et al.,* 2009).
Cependant cette étude n'a pas mis en évidence d'expression différentielle spécifique entre la seconde et troisième paire de pattes à l'exception de *gilt* et *Ubx* déjà étudiés pour leur implication dans l'évolution de la croissance des pattes chez les Gerridae.
Cela suggère que les mécanismes qui sont responsables de l'évolution de la croissance des pattes ne sont pas nécessairement différentiellement exprimés ou que *gilt* et *Ubx* peuvent à eux seuls expliquer le changement d'élongation observé entre la deuxième et la troisième paire de pattes. D'autre part, si un nombre conséquent de gènes était impliqué dans le réseau de gènes qui permet la croissance différentielle des pattes deux et trois des Gerromorpha, leurs taux d'expression pourraient être relativement proches, de ce fait notre transcriptome ne nous permettrait peut-être pas de mettre en évidence ces subtiles différences d'expression.

Tableau 1 : Liste des gènes du crible et taux d'expression à partir du transcriptome

			Pré-katatrepsis		Post-katatrepsis	
Isogroup	Gêne	abbréviation	Patte 2	Patte 3	Patte2	Patte 3
07469	bric a brac	bab	2.93	1.93	0.63	0.57
00234	brahma	brm	26.25	28.04	6.57	5.19
07025	brinker	brk	58.69	57.70	16.14	22.41
05369	combgap	cg	70.65	72.74	19.77	25.07
01740	cramped	crm	62.76	67.44	15.97	19.34
05253	female sterile (1) homeotic	fs(1)h	12.50	11.66	2.36	1.93
02940	ftz transcription factor 1	ftz-f1	8.01	7.53	3.34	5.07
14152	hairy	h	25.08	33.87	4.43	5.05
04113	Iroquois-family-Like	Iro-like	13.32	12.60	4.65	3.30
00355	kismet	kis	49.42	46.06	8.15	7.53
00494	Kruppel	Kr	192.16	230.26	189.81	259.47
05280	moira	mor	135.44	130.12	13.51	14.35
06560	Nucleosome remodeling factor	Nurf	27.98	30.46	11.00	13.59
07869	osa	osa	60.75	52.29	11.34	9.07
03220	ovo/shavenbaby	ovo/svb	103.52	128.30	97.35	92.08
08027	polybromo	poly	50.48	56.24	15.90	13.49
07277	rpd3	rpd3	55.91	53.04	3.55	3.46
01677	Sp-family-like	Sp-like	99.71	94.37	45.15	33.29
02507	tiptop	tio	48.36	49.05	8.02	6.02
12889	Transcription factor AP-2	TfAP-2	49.36	52.22	10.71	8.77
07233	protein with btb domain	x	127.47	140.29	0.90	1.03
03008	protein with ZF domain	x	28.27	27.70	6.48	6.90
03008	unknown	x	15.23	11.07	0.36	0.35

Liste de gènes basée sur leurs taux d'expressions provenant de l'analyse transcriptomique. L'isogroupe est le numéro du gène correspondant au numéro référent du transcriptome. Le nom du gène est obtenu à l'aide de blast contre la base de données NR de NCBI. Une phylogénie a été réalisée pour certains gènes (Annexes 14 à 17). Les abréviations sont basées sur celles connues chez *D. melanogaster* et indiquées sur Flybase. Deux regroupement de stades ont été testés : ceux avant la katatrepsis correspondant à la colonne « pré-katatrepsis » et après la katatrepsis correspondant à la colonne « post-katatrepsis ». Les taux d'expressions sont indiqués pour la seconde et troisième paire de pattes et exprimés en RPKM (Reads Per Kilobase per Million mapped reads). En jaune le gène ovo/shavenbaby *(ovo/svb)* est étudié dans le second chapitre du mémoire.

Nous avons donc utilisé une autre stratégie, qui consiste à comparer l'expression des gènes à deux stades différents. Ces stades étant en accord avec des études précédentes qui ont montré que la croissance des pattes est établie très tôt durant l'embryogénèse et maintenue à la fin de l'embryogenèse après la katatrepsis (stade où l'embryon effectue une rotation de 180 degrés au sein de l'œuf) (Fig.17), (Refki *et al.,* 2014), (Armisén *et al.,* 2015).

Afin de diminuer le nombre considérable de candidats, nous nous sommes focalisés sur une seule classe de gènes : les facteurs de transcriptions (FT). En effet, ceux-ci sont nécessaires à la régulation de la transcription des gènes en interagissant directement avec l'ADN. Une augmentation de l'expression d'un facteur de transcription impliqué dans la croissance des pattes est donc capable en théorie d'augmenter l'élongation dans le tissu associé. Pour réaliser cette liste de facteurs de transcriptions nous avons comparé la séquence des gènes du transcriptome avec des bases de données de FT de la *Drosophile* (flyTF.org) ce qui nous a permis de mettre en évidence 868 FT homologues à ceux de la Drosophile.

Un dernier filtre d'analyse a permis de sélectionner à l'aide d'études bibliographiques des gènes qui avaient déjà été testés pour leur implication dans la croissance ou la formation des appendices afin de restreindre la liste des gènes candidats (Annexe 13), néanmoins nous avons également testé trois facteurs de transcription pour lesquels nous n'avons pas trouvé d'homologue chez la Drosophile et qui pourraient être spécifiques des Gerromorpha.

Cette stratégie a permis de sélectionner au total vingt-quatre FT (Tab.1) présentant une expression différentielle entre les deux stades analysés et pour lesquels des études sur la croissance des appendices ont été réalisées dans le passé (Annexe 13).

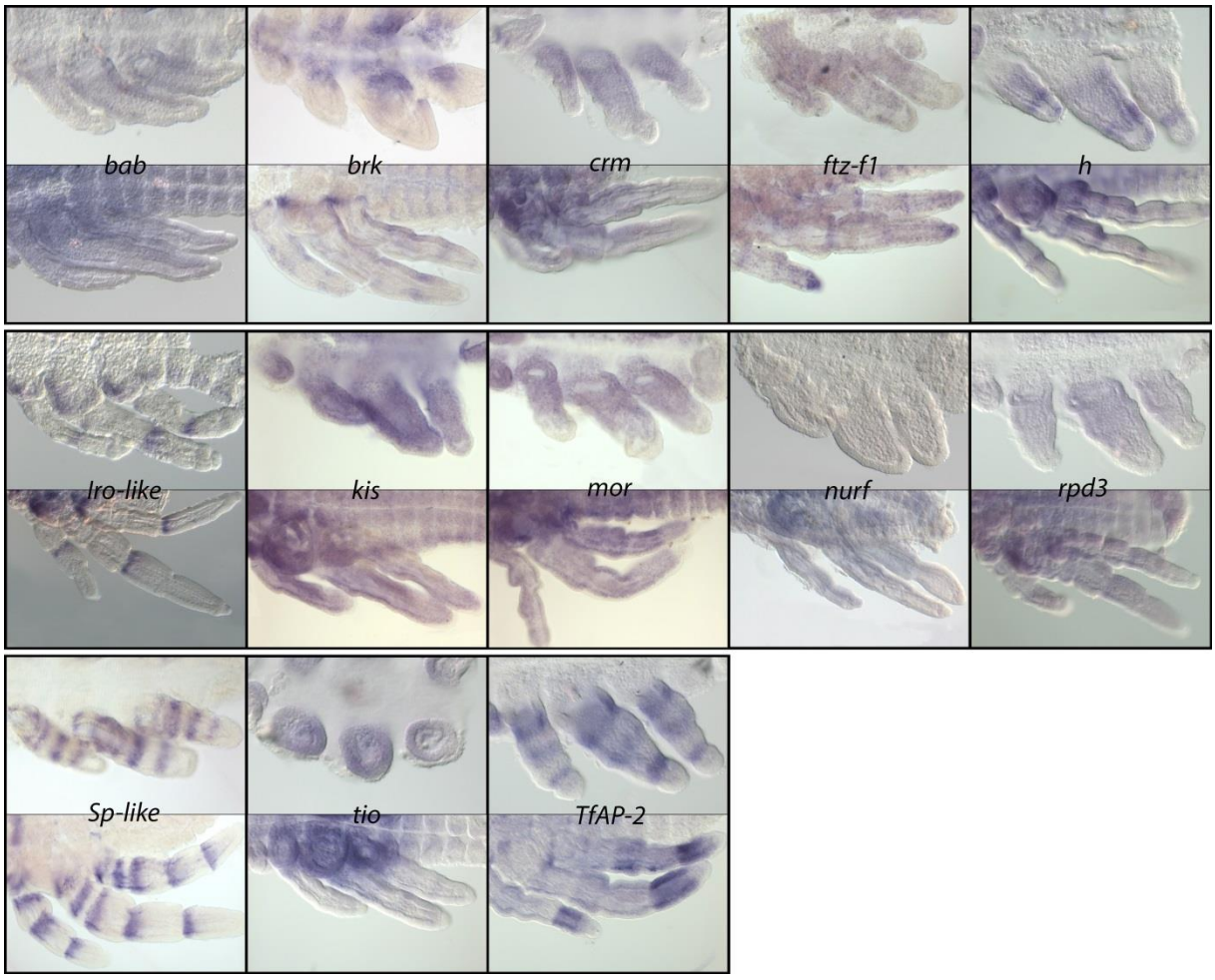


Figure 18 : Profil d'expression des gènes de la liste à partir du transcriptome

Profil d'expression des gènes à partir d'hybridations *in situ* (HIS). Deux stades sont testés pour chaque gène : stade pré-katatrepsis sur les photos du haut et stade post-katatrepsis sur les photos du bas. Il faut mieux légender la figure

On remarque que pour une majorité des gènes, l'expression semble diffuse dans l'embryon et non différentielle entre les pattes, néanmoins un certain nombre de gènes montre une expression en bandes caractéristiques des gènes segmentaires qui sont impliqués dans l'élongation proximo-distal des pattes.

Abréviations : voir Tab.1

b. Profil d'expression des gènes candidats

Dans le but de déterminer si ces facteurs de transcription sont capables de moduler la croissance des pattes, nous avons déterminé leurs domaines d'expressions à l'aide de la technique d'hybridation *in situ* (HIS) (Annexe 10). Les facteurs de transcription sont des gènes qui interagissent directement avec l'ADN et/ou l'ARN polymérase et doivent donc être exprimés dans les pattes pour avoir un effet sur la croissance de celles-ci.

Tous les gènes que nous avons pu tester par hybridations *in situ* (Fig.18) sont bien exprimés dans les pattes, confirmant ainsi les données du transcriptome. Néanmoins, la moitié d'entre eux tels que *rpd3, kismet (kis)* ou *moira (mor)* montre une expression ubiquitaire, c'est-à-dire qu'ils sont exprimés dans l'embryon entier et non spécifiquement dans les pattes. Ce type d'expression est malheureusement non différenciable d'embryons qui ont été marqués avec une sonde aspécifique (qui se fixe sur n'importe quel ARNm). De plus l'expression des gènes semble identique dans toutes les pattes et donc ne peut pas expliquer comme *Ubx* l'extrême élongation visible dans la seconde paire de pattes.

Parmi les gènes ayant une expression spécifique, *fushi tarazu-f1 (ftz-f1)* est exprimé aux deux stades testés. Le premier stade, avant la katatrepsis, montre une expression en petites taches tout le long de l'embryon. Celles-ci sont très diffuses et également présentes dans le corps avec une quantité plus importante dans les pattes.
Après ou pendant la katatrepsis, l'expression de *ftz-f1* est très similaire au stade précédent, cependant les spots d'expression semblent très fortement exprimés dans la partie distale des pattes au niveau du tarse. De plus une expression segmentaire au niveau des futures jonctions des segments est visible particulièrement entre le fémur et le tibia.

D'autres gènes révèlent une expression spécifique et segmentaire tel que *hairy (h), Iroquois-family-Like (Iro-like), Sp-family-like (Sp-like) et Transcription factor AP-2 (TfAP-2).*

Le gène *h* est exprimé dans les pattes de façon diffuse avec une expression additionnelle en bande au niveau distal de chacune des pattes.
Plus tardivement, son expression apparait dans le corps et devient plus forte. Celle-ci est toujours présente dans les pattes avec trois bandes d'expression au niveau des futures jonctions des segments.

Iro-like est exprimé de la même manière aux deux stades testés. Il présente une expression au niveau du coxa et trois bandes d'expression au niveau des futures jonctions des segments. L'expression est plus intense au niveau de la jonction fémur-tibia.

Sp-like montre une expression segmentaire tout au long de l'embryogénèse. Cette expression est représentée par quatre à cinq bandes dans chacune des pattes de l'embryon.

Tableau 2 : Pourcentage des modifications observées pour *Sp-like*^{ARNi}

***Sp-like*_1µg/µL (95% phénotypes ARNi)**					
Phénotype	23/01/17 au 27/01/17	27/01/16 au 3/02/17	03/02/2017 au 10/02/17	Total	% phénotypes
WT	12	0	0	12	5
Défauts segmentation P-D pattes	25	0	30	55	22
Absence développement	29	100	59	188	73
Total	66	100	89	255	100

Tableau 3 : Pourcentage des modifications observées pour *TfAP-2*^{ARNi}

***TfAP-2*_1µg/µL (95% phénotypes ARNi)**						
Phénotype	23/01/17 au 27/01/17	27/01/16 au 3/02/17	03/02/2017 au 10/02/17	10/02/17 au 17/02/17	Total	% phénotypes
WT	32	0	0	49	81	26
Défauts segmentation P-D pattes	7	160	33	7	207	67
Absence développement	23	0	0	0	23	7
Total	62	160	33	56	311	100

Les pourcentages des phénotypes ARNi sont calculés à partir du nombre d'embryons manifestant des défauts dûs à l'ARNi. Il est fréquent que les premiers embryons pondus par la femelle après l'injection aient un phénotype sauvage car le double brin n'a pas eu le temps de faire effet. Le double brin agit en général pendant trois à quatre semaines et lorsqu'on observe uniquement des individus sauvages à cette période on arrête le comptage.

Pour chacun des gènes, au moins deux femelles ont été injectées indépendamment pour vérifier la répétabilité des phénotypes.

Pour ces deux tableaux les WT (wild type : sauvage) correspondent aux embryons pour lesquels aucune modification morphologique ou comportementale ne sont observées ; les défauts de segmentation P-D (proximo distal) définissent des embryons qui montrent des défauts le long des segments des appendices. Enfin l'absence de développement est caractérisée par des embryons blancs où le développement n'a pas débuté.

Pour chacune des injections nous obtenons des phénotypes *Sp-like* et *TfAp-2* ARNi similaires, on observe un pourcentage de modification dû à l'ARNi très important avec 95% de modifications observées pour chacun des ARNi.

Enfin *TfAP-2* montre également une expression segmentaire au début de l'embryogénèse. Elle est caractérisée par trois bandes relativement larges. Plus tardivement, ces bandes deviennent beaucoup plus localisées dans la partie distale des pattes bien qu'elles restent présentes dans la totalité de la patte.

Nous avons donc décidé de nous focaliser sur les gènes qui ont montré une expression spécifique dans les pattes : *ftz-f1, hairy, Iro-like, Sp-like et TfAP-2*. Afin de vérifier si ces gènes étaient impliqués dans la croissance générale des pattes des Gerromorpha. L'identité des gènes a été vérifiée à l'aide d'arbres phylogénétiques (Annexes 13 à 17) cependant ceux-ci n'ont pas permis d'identifier *Iro-like* qui appartient à un des gènes de la famille Iroquois (Annexe 15) et *Sp-like* qui appartient à un des gènes de la famille Sp (Annexe 16).

c. Fonctions des gènes exprimés dans les pattes

Nous avons testé la fonction de chacun des gènes par la méthode d'ARN interférent (ARNi) qui conduit à la dégradation partielle ou totale de l'ARN messager complémentaire à la séquence de l'ARN double brin synthétisé de chacun des gènes choisis. Cette dégradation permettra ainsi la diminution de la protéine du gène ciblé qui ne pourra plus effectuer sa fonction in-vivo (Agrawal et al., 2003), (Kole et al., 2012). Cette perte de fonction nous aidera donc à déterminer la fonction des gènes ciblés.

L'injection du double brin est réalisée dans la circulation (hémolymphe) des femelles au niveau génital, de manière à ce que les phénotypes de chacun des gènes soient observés sur sa descendance. Les embryons ARNi sont analysés et comparés à des embryons sauvages sous loupe binoculaire afin de désigner si le double brin injecté a bien affecté leurs phénotypes (Fig.19 à 21).
La proportion des phénotypes observés est comptabilisée afin de déterminer un pourcentage du nombre d'embryons représentatifs des phénotypes observés (Tab.2 à 7).
Chaque injection pour les gènes désignée précédemment (*ftz-f1, hairy, Iro-like, Sp-like et TfAP-2*) a conduit à des modifications morphologiques exceptées pour *hairy*.

❖ Sp-like et TfAP-2

L'ARNi de *Sp-like* a révélé deux types de phénotypes : 22% des embryons présentent des défauts au niveau des pattes et 74% semblent ne pas se développer, ils restent blancs tout au long du développement
Les embryons issus de deux femelles sauvages ont été observés en parallèle des embryons *Sp-like*^{ARNi} et seulement 1% à 5% des embryons ne se sont pas développés. Ceci suggère que les embryons ne se développant pas pour les femelles *Sp-like*^{ARNi} sont soit dû à l'absence de Sp-like soit l'injection a endommagée l'appareil génital des femelles.
Néanmoins 22% des embryons montrent des phénotypes très caractéristiques et reproductibles au niveau des pattes. De plus, au total 255 embryons ont été observés et seulement douze se sont révélés sans modification visible ce qui suggère que l'injection d'ARNdb spécifique du gène *Sp-like* a bien fonctionnée (Fig.19) (Tab.2).

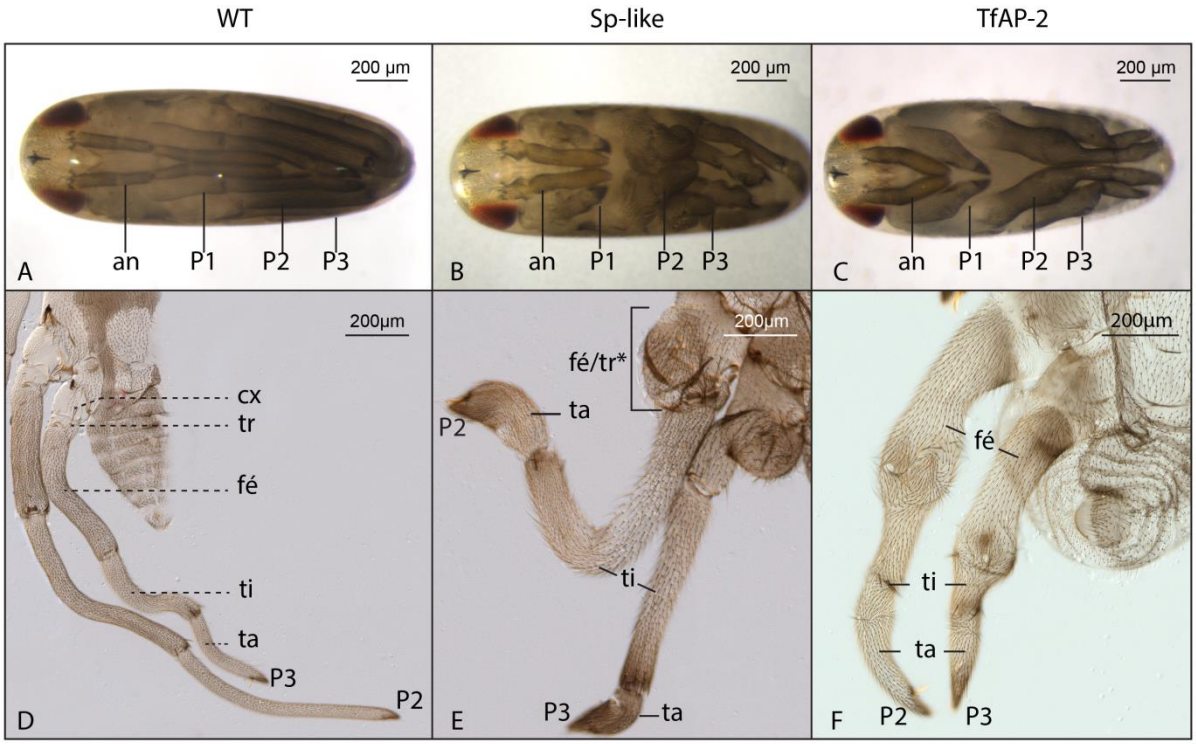


Figure 19 : ARNi des gènes *Sp-like* et *TfAP-2*

Modifications observées après l'injection du double brin spécifique des gènes *Sp-like* (B, E) et *TfAp-2* (C, F) comparées à des embryons sauvages (WT) (A, D). Des grossissements des modifications dûes à l'ARNi sont représentés en (E-F) comparés à l'embryon sauvage (D). Une fusion du fémur avec le trochanter est représentée par les abréviations (fé/tr*).

Abréviations : an : antenne ; P1 : patte 1 ; P2 : patte 2 ; P3 : patte 3 ; cx : coxa ; tr : trochanter ; fé : fémur ; ti : tibia ; ta : tarse.

Les embryons *Sp-like*^{ARNi} qui présentent des défauts au niveau des pattes montrent un raccourcissement visible de tous les appendices (Fig.19-B). En effet, les antennes qui normalement croissent jusqu'au niveau du troisième segment abdominal s'arrêtent au niveau du deuxième segment thoracique. La taille de la première paire de patte est également diminuée, elle devrait normalement atteindre le milieu du septième ou du huitième segment abdominal (Fig.19-A-B). Pour la seconde et troisième paire de pattes, elles sont visibles uniquement du côté ventral de l'embryon. Ces paires de pattes croissent normalement jusqu'au pôle postérieur puis passent du côté latéral pour s'arrêter au niveau de l'œil pour la seconde paire de patte et au niveau du troisième segment thoracique pour la troisième paire de pattes (Fig.19-A-B).

Après dissection, des grossissements au microscope ont également permis de révéler des modifications des segments des pattes avec une probable fusion du fémur (fé) et du trochanter (tr) (Fig.19-E). Le tarse est arrondi et des structures spécifiques du dernier segment distal sont absentes telles que les griffes et le parempodia, ce qui suggère que le tarse est mal spécifié (Fig.19-E).

L'ARNi de *Sp-like* a donc permis de mettre en évidence des défauts au niveau de la formation des pattes avec des défauts de segmentation sur l'axe proximo-distal, ainsi qu'une diminution sévère de la taille globale des pattes.

L'injection du double brin de *TfAP-2* a révélé des phénotypes très similaires à ceux observés pour les embryons *Sp-like*^{ARNi}. Sur les 311 embryons analysés, 7% ne se développent pas, 26% ne présentent pas de modification visible et pour les 67% restant, des défauts sont visibles au niveau des pattes. Concernant les embryons présentant un phénotype sauvage, ils ont majoritairement été pondus peu de temps après l'injection, ce qui suppose qu'ils n'ont peut-être pas intégrés le double brin. Une autre partie de ces embryons a été pondue trois semaines après l'injection, période à laquelle le double brin commence à être limité. Toutes ces données suggèrent que l'injection du double brin a bien fonctionnée pour le gène *TfAP-2* malgré un nombre important d'embryons sans modification visible (Fig.19) (Tab3).

Comme pour l'injection de *Sp-like*, les embryons *TfAP-2*^{ARNi} présentent un raccourcissement visible de tous les appendices (Fig.19-C). Ces défauts d'élongation semblent de même intensité que ceux visibles pour les embryons *Sp-like*^{ARNi} avec des raccourcissements de pattes qui atteignent une longueur similaire (Fig.19-C).

Aucune fusion des segments n'est visible en absence du gène *TfAP-2*, néanmoins les jonctions entre les segments des pattes semblent moins marquées ce qui suppose que les segments sont mal spécifiés (Fig.19-F). On peut également observer qu'à l'emplacement des jonctions la disposition des poils est désorganisée ce qui conforte l'hypothèse que les jonctions des segments et la spécification des segments sont perturbées (Fig.19-F).

L'inactivation du gène *TfAP-2* a généré des embryons avec un raccourcissement sévère de la taille globale des pattes ainsi que des défauts importants de segmentation proximo-distale, tout comme pour *Sp-like*^{ARNi}.

Tableau 4 : Pourcentage des modifications observées pour ftz-f1^{ARNi} (3.6µg/µL ARNdb)

*ftz-f1*_3,6 µg/µL (34% phénotypes ARNi)				
Phénotype	23/01/17 au 27/01/17	27/01/16 au 3/02/17	Total	% phénotypes
WT	83	90	173	66
Défauts taille de patte	38	0	38	14
Défauts segmentation A-P	16	3	19	7
Absence développement	3	31	34	13
Total	140	124	264	100

Pour la concentration à 3.6µg/µL trois femelles ont été injectées indépendamment pour vérifier la répétabilité des phénotypes.

Tableau 5 : Pourcentage des modifications observées pour ftz-f1^{ARNi} (1µg/µL ARNdb)

*ftz-f1*_1 µg/µL (78% phénotypes ARNi)				
Phénotype	23/01/17 au 27/01/17	27/01/16 au 3/02/17	Total	% phénotypes
WT	14	0	14	22
Défauts taille de patte	10	0	10	16
Défauts segmentation A-P	2	0	2	3
Absence développement	24	14	38	59
Total	50	14	64	100

Tableau 6 : Pourcentage des modifications observées pour ftz-f1^{ARNi} (0.1µg/µL ARNdb)

*ftz-f1*_0,1 µg/µL (88% phénotypes ARNi)					
Phénotype	23/01/17 au 27/01/17	27/01/16 au 3/02/17	3/02/17 au 6/02/17	Total	% phénotypes
WT	5	0	4	9	12
Défauts taille de patte	30	0	0	30	39
Défauts segmentation A-P	4	0	0	4	5
Absence développement	23	3	7	33	43
Total	62	3	11	76	100

Deux femelles ont été injectées indépendamment pour vérifier la répétabilité des phénotypes.
Le calcul des pourcentages de modifications dues à l'injection du double brin a été réalisé de la même manière que pour les tableaux 3 et 4 avec l'ARNi de *Sp-like et Tf-Ap2*.
Pour ces trois tableaux, les WT correspondent aux embryons pour lesquels aucune modification morphologique ou comportementale n'est observée. Les défauts de pattes sont caractérisés par des diminutions de la taille des pattes et/ou par des défauts de développement des poils. L'absence de développement est caractérisée par des embryons blancs ou le développement n'a pas débuté. Enfin, les défauts de segmentation A-P (antéro-postérieur) définissent des embryons qui montrent des malformations le long de l'axe antéro-postérieur.
Pour chacune des concentrations, nous obtenons des phénotypes *ftz-f1^{ARNi}* similaires à la première injection à 3.6 µg/µL. On observe 34% de modification pour les femelles à 3.6 µg/µL, 78% pour celle à 1µg/µL et 88% pour les femelles à 0.1µg/µL.

Tableau 7 : Pourcentage des modifications observées pour *Iro-like*^{ARNi} (femelle A et B)

***Iro-like*_1µg/µL (81% phénotypes ARNi)**				
Phénotype	23/01/17 au 27/01/17	27/01/16 au 3/02/17	Total	% phénotypes
WT	15	0	15	19
Défauts taille de patte	25	34	59	73
Défauts segmentation A-P	0	3	3	4
Absence développement	5	2	7	9
Total	45	36	81	100

Tableau 8 : Pourcentage des modifications observées pour Iro-like^{ARNi} (femelle C et D)

***Iro-like*_1µg/µL (78% phénotypes ARNi)**		
Phénotype	Total	% phénotypes
WT	20	22
Défauts taille de patte	43	46
Défauts segmentation A-P	5	5
Absence développement	25	27
Total	93	100

Le calcul des pourcentages de modifications dues à l'injection du double brin a été réalisé de la même manière que pour les tableaux 3 à 6 avec les ARNi de *Sp-like, Tf-Ap2,* et *ftz-f1.*
Deux femelles ont été injectées indépendamment pour vérifier la répétabilité des phénotypes.
Pour ces deux tableaux (7 et 8), colonne correspondent aux mêmes défauts observés pour ftz-f1.
Pour chacune des injections, nous obtenons des phénotypes *Iro-like*^{ARNi} similaires et nous observons un pourcentage de modifications dû à l'ARNi très important avec 81% de modifications observées pour la première injection et 78% pour la seconde injection.

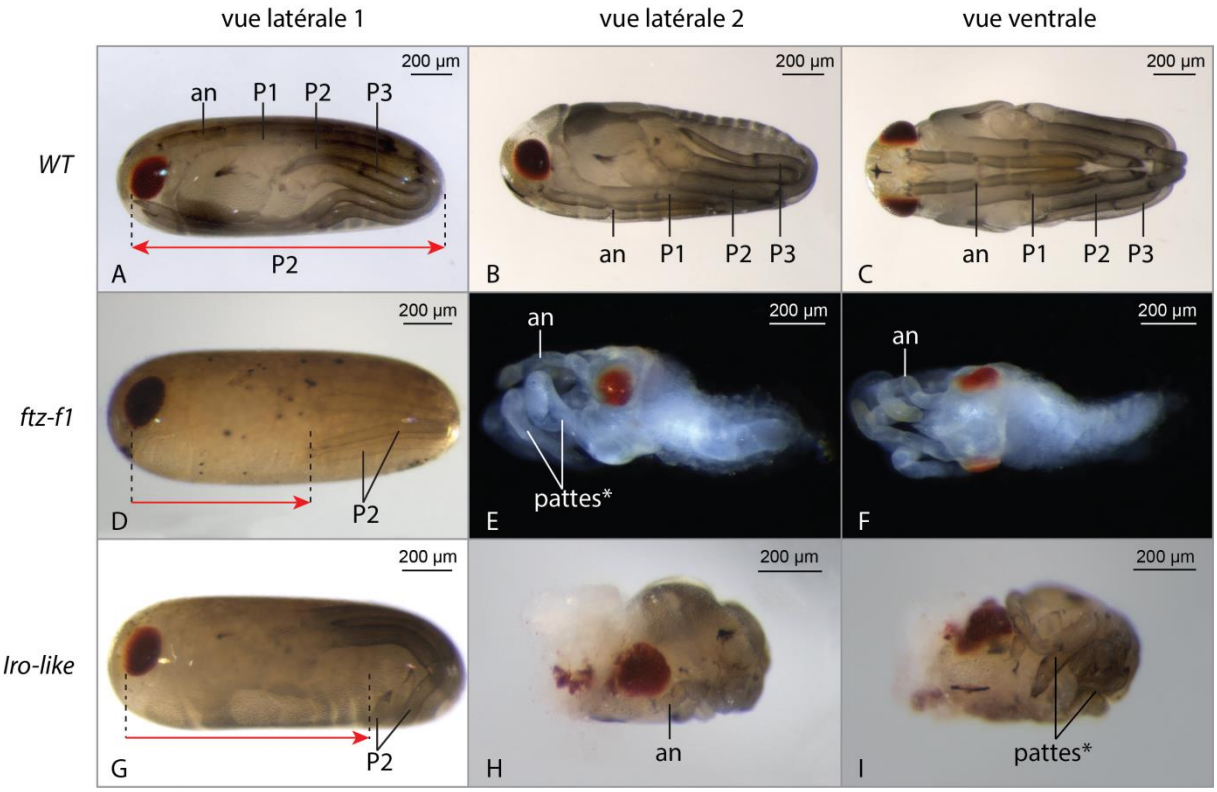


Figure 20 : ARNi des gènes *ftz-f1* et *Iro-like.*

Modifications observées après l'injection du double brin spécifiques des gènes *ftz-f1* (D à F) et *Iro-like* (G à I) comparées à des embryons sauvages (*WT*) (A à C). Deux vues latérales (avant et après dissection) et une vue ventrale sont présentes pour une meilleure visualisation des modifications de l'ARNi. Différentes sévérités de modifications sont présentées avec des embryons présentant des défauts au niveau des pattes (D-G) et des défauts de segmentation antéro-postérieurs (E, F, H et I). Les appendices qui paraissent modifiés avec des fusions ou des troncations sont représentés avec une étoile « * ».

Les défauts de pattes sont caractérisés pour *ftz-f1* et *Iro-like* par des pattes raccourcies, notamment pour la seconde paire de pattes où la taille de celles-ci est représentée par une flèche rouge sur les photos en vue latérale (A-D-G).

Abréviations : an : antenne ; P1 : patte 1 ; P2 : patte 2.

❖ ftz-f1

L'injection du double brin *ftz-f1* nous a permis d'obtenir différents types de modifications (Fig.20), (Tab.4 à 6). Nous avons donc décidé d'injecter plusieurs concentrations du double brin afin de déterminer si celles-ci étaient reproductibles. Chacune des concentrations testées a permis de mettre en évidence des phénotypes similaires avec des proportions relativement proches pour chaque type de modification. Les phénotypes des embryons^{ARNi} observés sont en représentation significative (34%, 78% et 88%), et consistante du fait que l'on obtient des modifications sur les embryons de chaque femelle indépendante, l'injection d'ARN de *ftz-f1* a donc bien fonctionné (Fig.20) (Tab.4 à 6).

L'injection du double brin de *ftz-f1* est majoritairement létale pour les trois concentrations (13%, 59% et 43% de taux de mortalité). Néanmoins, on obtient des embryons qui semblent atteindre la fin du développement mais qui présentent une diminution de la taille des pattes (Fig.20-D). En effet au moins la seconde paire de pattes parait plus courte car elle n'atteint pas l'œil contrairement aux embryons sauvages (14%, 16% et 39%).

Ces mêmes embryons sont parfois plus transparents et les poils sont difficilement visibles, ce qui pourrait correspondre à des défauts au niveau de la cuticule (Fig.20-D). Une observation au microscope de ces embryons a permis de montrer que les poils étaient bien présents mais qu'ils sont transparents ce qui suggère que le mécanisme de mélanisation durant la fin du développement n'a probablement pas eu lieu. Cette malformation a également été observée en absence de diminution de la seconde paire de pattes, ce qui suggère que ces deux mécanismes se produisent indépendamment.

Enfin, un petit nombre d'embryons montre des phénotypes de malformation très sévères qui affectent la segmentation antéro-postérieure (7%, 3% et 5%) (Fig.20-E-F). En effet, ces embryons semblent avoir des segments antéro-postérieurs et des appendices absents. Uniquement une paire de pattes et d'antennes sont présentes sur certains embryons (Fig.20-H). De plus, les appendices présents s'apparentant à des pattes sont rattachés à la tête, ce qui suggère que les segments thoraciques d'où les pattes se développent sont absents (Fig.20-H). Ces malformations critiques peuvent expliquer pourquoi un nombre si important d'embryons ne se développe pas.

L'ARNi de *ftz-f1* provoque donc de multiples modifications au niveau de la formation des pattes avec une diminution de leur taille et une perturbation du développement des poils. D'autres embryons *ftz-f1*^{ARNi} ont révélé des malformations précoces de l'embryon entier qui s'apparentent à des défauts de segmentation antéro-postérieure.

❖ Iro-like

L'ARNi *d'Iro-like* a montré, tout comme les gènes précédents, différentes classes de phénotypes incluant au total une centaine d'embryons provenant de deux femelles indépendantes. Sur la totalité de ces embryons ayant été analysés, 81% et 78% ont présenté des modifications suggérant que l'injection du double brin pour le gène *Iro-like* a bien fonctionné (Fig.20) (Tabs.7-8).

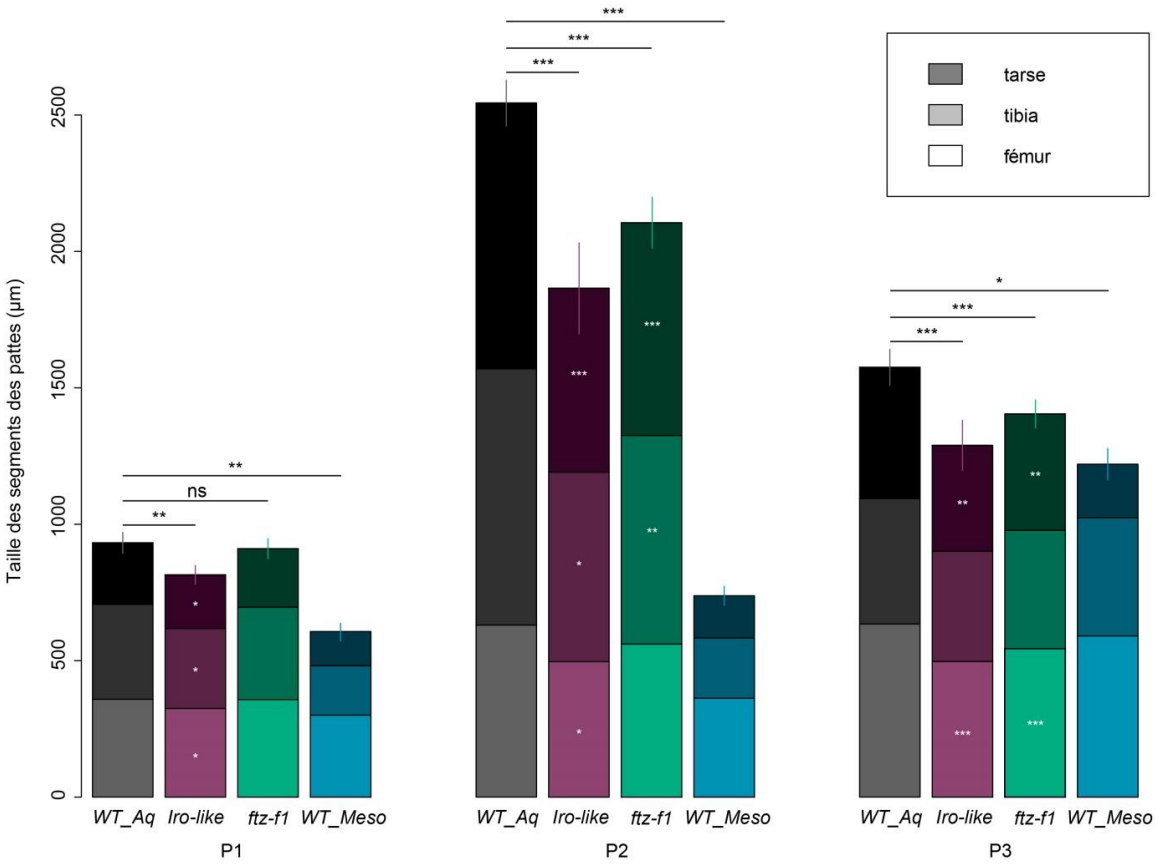


Figure 21 : Taille des pattes et des segments pour les embryons *Iro-like*^{ARNi} et *ftz-f1*^{ARNi}

Représentation graphique de la quantification des défauts d'élongation des pattes causés par l'ARNi d'*Iro-like* (violet) et *ftz-f1* (vert). Deux contrôles ont été réalisés à l'aide des mesures effectuées sur des embryons sauvages d'*A. paludum (WT_Aq)* et *M. mulsanti (WT_Meso).* Chaque mesure a été réalisée au même stade de développement, à savoir à la fin de l'embryogenèse, afin de pouvoir comparer chacune des conditions. Chaque segment a été mesuré, le tarse est représenté en nuance foncée, le tibia en clair et le fémur en très clair.
La significativité des données a été testée à l'aide d'une Ancova (Annexes 19 à 23), prenant en compte la longueur du corps après avoir vérifié que la distribution des données était normale (Annexe.18). Les p.values significatives sont représentées par des étoiles, et les non significatives par « ns ». L'écart type de l'ensemble des données a été mesuré pour mettre en évidence la dispersion de ces données autour de la moyenne de la taille des pattes, pour chaque condition, elle est représentée par la barre en haut de chaque colonne.
Le code pour les p.value est : 0 '***' 0.001 '**' 0.01 '*' 0.05 '.' 0.1 ' ' 1

Tableau 9 : Récapitulatif des segments affectés par l'ARNi pour les gènes *Iro-like* et *ftz-f1*

	P1			P2			P3		
Segments	Fémur	Tibia	Tarse	Fémur	Tibia	Tarse	Fémur	Tibia	Tarse
Iro-like	x	x	x	x	x	x	x		x
ftz-f1					x	x	x		x

Dans ce tableau nous avons identifié par des croix les segments qui montrent une diminution de taille lors de l'ARNi.

La majorité des embryons^{ARNi} montre des phénotypes qui affectent l'élongation des pattes très similaires à ceux observés pour les embryons *ftz-f1*^{ARNi} (73% et 46%) (Fig.20-G). Une faible proportion des embryons ne se développe pas (9%). Enfin dans de rares cas (mais sur deux femelles indépendantes) certains embryons montrent des malformations très sévères avec uniquement certains segments antérieurs présents, mais la majorité des appendices absents. Certains appendices ainsi que les yeux sont présents, néanmoins les appendices sont incomplets et semblent fusionnés entre eux avec la tête (Fig.20-J).

La diminution de l'expression du gène *Iro-like* semble donc affecter la taille des pattes et la segmentation antéro-postérieure de l'embryon tout comme le gène *ftz-f1*.

❖ Quantification des défauts d'élongation pour les embryons *ftz-f1*^{ARNi} et *Iro-like*^{ARNi}

La diminution de la taille des pattes, observée dans le cas des ARNi pour les gènes *Iro-like* et *ftz-f1*, a été quantifiée. Cela nous a permis de déterminer si les pattes étaient réellement diminuées, puis nous avons pu définir quelles pattes et quels segments sont affectés (Annexe 24). Les mesures des embryons dans les deux conditions ont été réalisées à l'aide d'embryons ARNi provenant des injections précédemment décrites. Ces embryons ont été sélectionnés lorsqu'aucune autre malformation en dehors de la taille des pattes n'était visible. La représentation graphique de ces mesures a été réalisée pour une meilleure visualisation des modifications des ARNi comparés aux embryons sauvages (Fig.21).

Afin de déterminer si les différences entre les embryons ARNi et les embryons sauvages sont significativement différentes nous avons réalisé des analyses statistiques (ANCOVA) en prenant en compte la taille relative du corps dans chacune des conditions (Annexes 18 à 23).
Ces analyses ont montré que les pattes deux et trois sont significativement diminuées pour *Iro-like*^{ARNi} et *ftz-f1*^{ARNi} (Annexe 20), et la première paire de pattes est uniquement diminuée pour *Iro-like*^{ARNi} comparé aux embryons sauvages (Annexe 20).

Nous avons également réalisé les mêmes analyses en prenant en compte chaque segment de la patte (Annexes 18 à 23), de cette manière nous avons été capables d'évaluer quels segments sont modifiés dans chacune des pattes et dans chaque condition.
Pour la première paire de pattes, on remarque *qu'Iro-like*^{ARNi} montre une diminution de chacun des segments. Dans la seconde paire de pattes, la taille de chaque segment est plus courte pour *Iro-like*^{ARNi}, cependant pour *ftz-f1*^{ARNi} uniquement la taille du tibia et du tarse est diminuée (Annexe 22). Enfin la taille de la troisième paire de pattes des embryons *Iro-like*^{ARNi} et *ftz-f1*^{ARNi} est également diminuée, avec tous les segments affectés excepté le tibia (Annexe 23).

Ces données réunies nous permettent de montrer que la taille des pattes est globalement affectée par l'inactivation des gènes *ftz-f1* et *Iro-like*, et plus spécifiquement que certains segments sont affectés en fonction des pattes et du gène.

3. Discussion

a. Choix des gènes à partir du transcriptome

Les gènes testés ont été définis à l'aide de l'expression des gènes entre la seconde paire et la troisième paire de pattes du transcriptome comparatif. Cette liste de gènes nous a permis de mettre en évidence des gènes exprimés spécifiquement dans les pattes. L'étude de la fonction d'un échantillon de gènes provenant de cette liste a révélé des fonctions associées à la formation et à la croissance des pattes. Cela suggère que la façon dont nous avons désigné la liste des gènes à partir du transcriptome est correcte.

Néanmoins aucun des gènes testés nous a permis de mettre en évidence un patron d'expression différentielle entre la seconde et troisième paire de pattes malgré des différences d'expression significatives d'après l'étude transcriptomique. Ceci souligne les limites d'utilisation du transcriptome utilisé.

En effet le transcriptome ne ciblait pas un stade ou une fenêtre de temps exacte qui correspondait au changement de plan d'organisation des pattes. C'est à dire le moment où la taille de la deuxième paire de pattes devient plus grande comparée à la troisième paire de pattes. En effet les stades embryonnaires avant katatrepsis et après katatrepsis prenaient en compte un regroupement de différents stades pour un temps de développement relativement grand. Cela pourrait expliquer pourquoi nous ne sommes pas parvenus à mettre en évidence des gènes différentiellement exprimés entre la seconde et la troisième paire de pattes.

De plus nous avons limité notre étude à une classe de gènes restreinte comme les facteurs de transcription car notre transcriptome ne nous permettait pas d'avoir une courte liste de gènes candidats. Si les gènes permettant la croissance différentielle de la seconde et troisième paire de pattes appartiennent à une autre classe de gènes cela pourrait expliquer pourquoi nous ne sommes pas parvenus à les mettre en évidence. Par exemple certaines classes de gènes comme des enzymes peuvent expliquer la différence de croissance, comme l'ont montrées les expériences conduites sur l'insuline impliqué dans la croissance (Baker *et al.,* 1993). D'autres exemples d'enzymes impliquées dans la croissance existent comme gilt impliqué dans la croissance de la seconde paire de pattes des Gerridae et des Veliidae (Armisén *et al.,* 2015).

D'autre part nous avons identifié les facteurs de transcription à l'aide de base de données de *D. melanogaster,* qui est une espèce relativement éloigné phylogénétiquement des Gerromorpha cela nous a peut-être conduit à éliminer des facteurs de transcription qui aurait pu être intéressant pour notre question biologique.

Pour finir nous avons testé des gènes pour lesquels la fonction de croissance était déjà connue chez la Drosophile cela a donc grandement biaisé notre analyse. Par exemple *gilt* qui est impliqué dans la croissance des pattes des Gerridae (Armisén *et al.,* 2015) est un interferon gamma qui est initialement connu pour être impliqué dans l'immunité (West and Cresswell, 2013).

Si nous ne voulons donc pas nous restreindre dans le choix des gènes, et réaliser une analyse moins biaisée du transcriptome nous devons donc redéfinir les conditions de l'établissement de celui-ci, qui n'étaient probablement pas adéquate pour répondre à notre question biologique.

b. Fonction et expression des gènes étudiés

❖ *Sp-like* et *TfAP-2*

Les phénotypes résultant de l'injection du double brin *Sp-like* et *TfAP-2* se sont avérés très similaires. Les modifications affectant la taille globale des appendices impliquent que ces gènes sont probablement associés à la croissance des appendices. D'autre part de multiples malformations des segments proximo-distaux des appendices sont observées sur les embryons ARNi. Ceci nous permet de penser que la croissance des appendices des embryons est affectée par le biais de défauts de segmentation des appendices. De plus ces malformations proximo-distales sont en parfaite adéquation avec le patron d'expression en bandes segmentaires dans les appendices pour ces deux gènes.

D'après diverses études bibliographiques la famille *Sp-like* est impliquée dans une variété de processus développementaux chez les insectes. Par exemple chez *Oncopeltus Sp8 / Sp9* est impliqué dans la croissance des segments des pattes (Schaeper *et al.,* 2009). Alors que chez la Drosophile les gènes de la famille *Sp* sont impliqués dans la spécification des segments des pattes par l'intermédiaire du gène *buttonhead* (Schöck *et al.,* 1999) et dans la croissance des appendices à travers la signalisation Notch (Córdoba *et al.,* 2016). D'autre part chez *Drosophila*, *TfAP-2* a une implication dans la morphogenèse des jonctions des pattes (Kerber *et al.,* 2001).
Les fonctions connues de ces familles de gènes nous permettent d'affirmer nos résultats car elles semblent conservées y compris avec la Drosophile qui est éloignée d'un point de vue phylogénétique. *Sp-like* et *TfAp-2* sont donc surement associés à des fonctions impliquant la segmentation proximo-distale et la croissance des appendices.

Enfin cette fonction qui est conservée entre la Drosophile et les Gerridae ne semble pas différentielle entre la seconde et troisième paire de pattes, *Sp-like* et *TfAp-2* sont donc requis pour la croissance et le développement des appendices mais ces deux gènes ne semblent pas impliqués directement dans l'évolution du plan d'organisation des pattes des Gerridae.

❖ *Iro-like* et *ftz-f1*

L'ARNi de *Iro-like* et *ftz-f1* nous a permis, tout comme les deux gènes précédemment décrits, d'observer des défauts au niveau de la taille des pattes, cependant aucune malformation de la segmentation proximo-distale n'a été notée. D'autre part l'absence de ces deux gènes semble également affecter la segmentation antéro-postérieure des embryons.

Les gènes de la famille *Iroquois* sont impliqués dans différents processus du développement des arthropodes. Chez la Drosophile les gènes de la famille *Iroquois* sont par exemple impliqués dans la formation des disques imaginaux des ailes et le modelage d'organes sensoriels externes (Cavodeassi *et al.,* 2001). Le gène *ftz-f1* est lui principalement connu pour son rôle comme cofacteur du gène fushi tarazu (Ftz) dans le processus de segmentation antéro-postérieure de l'embryon (Yu *et al.,*

1997), (Guichet *et al.,* 1997) et aussi dans de nombreux autres processus comme la mort cellulaire ou la métamorphose (Mane-Padros *et al.,* 2010).

Les fonctions de ces gènes observés chez *A. paludum* sont donc en accord avec d'autres études ce qui renforce la vraisemblance de nos données. Ceci suggère que *ftz-f1* et *Iro-like* sont probablement associés à des fonctions de segmentation antéro-postérieure et de croissance des pattes chez les Gerridae cependant ces gènes n'ont pu participer à l'évolution du plan d'organisation des pattes des Gerridae car ils perturbent la croissance de la seconde et de la troisième paire de patte.

Enfin les fonctions communes impliquées dans la segmentation et la croissance des quatre gènes que nous avons testés suggèrent que des gènes impliqués tôt dans le développement sont capables de réguler l'élongation des pattes des Gerridae. L'étude de gènes développementaux impliqués dans la segmentation du corps et des pattes, pourrait donc nous conduire à mieux comprendre les mécanismes de croissance qui ont conduit à l'évolution de la taille des pattes des Gerridae.

- Quantification des défauts d'élongation pour *ftz-f1*^{ARNi} et *Iro-like*^{ARNi}

Nous avons montré que la taille globale des pattes était diminuée lorsque l'expression de *ftz-f1* et *Iro-like* était inhibée par ARNi.

A l'aide de quantification de ces défauts d'élongation nous sommes parvenus à affirmer que certains segments semblaient affectés contrairement à d'autres qui ne semblaient pas modifiés en taille. Par exemple la taille du tibia de la troisième paire de pattes est inchangée pour les embryons *ftz-f1*^{ARNi} et pour *Iro-like*^{ARNi}.
Cependant les gènes *Iro-like* et *ftz-f1* ne semblaient pas être exprimés différentiellement dans les segments des pattes. Nous pouvons donc nous demander pourquoi l'absence de ces deux gènes ne semble pas affecter les segments de façon homogène ?
Nous n'avons aucune indication biologique qui pourrait expliquer ce phénomène néanmoins il serait intéressant de vérifier si l'expression de ces gènes est différentielle entre les segments des différentes pattes à d'autres stades.

Ces données permettent d'émettre l'hypothèse que l'augmentation de la seconde paire de pattes des Gerridae est possiblement segment spécifique car les segments qui sont affectés entre la seconde et troisième paire de pattes sont différents. En outre l'évolution de la taille de la seconde paire de pattes des Gerridae est peut être dû à l'accumulation de diverses modifications dans chacun des segments. Plusieurs gènes pourraient donc être à l'origine de la croissance de différents segments de la patte comparé à la troisième paire de pattes afin d'obtenir une taille relative de la seconde paire de pattes très importante.

Pour finir si l'on quantifie la taille des segments *d'A. paludum* avant éclosion et au stade adulte on se rend également compte que la proportion de la taille des segments est différente entre ces deux stades. En effet au stade embryonnaire le tarse est le segment le plus grand de la seconde paire de pattes alors qu'au stade adulte il devient le plus petit. Ceci suggère que la dynamique de croissance diffère au cours du développement. Il serait donc intéressant de vérifier l'effet de l'ARNi de *ftz-f1* et *Iro-like* à d'autres stades du développement.

4. Conclusions & Perspectives

a. Etablissement d'une nouvelle liste de gènes candidats

Notre étude nous a permis de mettre en lumière quatre gènes distincts affectant la taille globale des pattes. Cependant aucun de ces gènes n'a montré un effet significativement plus important dans la seconde paire de pattes et qui pourrait donc expliquer le changement du plan d'organisation des pattes. Ces résultats associés avec des études similaires (Refki and Khila, 2015) suggèrent que les gènes durant l'embryogénèse, qui sont impliqués dans le nouveau plan d'organisation des Gerridae pourraient se limiter à *Ubx* et *gilt*.

b. Déterminer les cibles *d'Ubx* chez les Gerridae et les Mesoveliidae

Il serait donc intéressant de déterminer les cibles directes d'*Ubx* à l'aide d'un Chip-seq, et d'un anticorps spécifique *d'Ubx* cette technique permet d'étudier les interactions entre l'ADN et les protéines à l'échelle du génome. Ceci nous permettra donc d'identifier les cibles directes *d'Ubx.* Nous pourrons réaliser cette expérience en comparant les cibles d'*Ubx* dans les différentes paires de pattes d'un Gerridae. Ceci permettra de déterminer les différentes cibles *d'Ubx* dans la seconde et troisième paire de pattes pour lesquelles la fonction d'*Ubx* est différente.
Nous pourrions également réaliser la même étude mais cette fois-ci entre deux espèces différentes. L'une présentant un plan d'organisation des pattes ancestral comme les Mesoveliidae, et une autre espèce présentant un plan d'organisation des pattes dérivé tel que les Gerridae. Les gènes cible d'*Ubx* étant présents dans une des espèces et absents dans l'autre pourront donc être associés avec l'évolution du nouveau plan d'organisation des pattes.

D'autre part nous pourrions réaliser une nouvelle analyse trancriptomique. Ce nouveau transcriptome comprendrait les différentes pattes d'un Gerridae comme précédemment cependant nous pourrions effectuer les extractions de tissus à un stade bien précis. Nous devrons choisir une fenêtre de développement courte qui nous permet de réduire les stades développementaux du transcriptome et d'obtenir des taux d'expression plus précis car tous les embryons seront au même stade. Ce stade devra être en accord avec notre question biologique et donc se situé juste avant l'apparition du plan d'organisation dérivé (P2>P3). Le milieu du stade katatrepsis conviendrait donc parfaitement car il a lieu juste avant l'apparition du nouveau plan d'organisation des pattes des Gerridae. De plus il est présent chez tous les Gerromorpha, nous pourrions donc réaliser des transcriptomes pour d'autres espèces qui seront comparables. Le choix des espèces à comparer devrait présenter un plan d'organisation ancestral pour pour répondre à notre question biologique. La comparaison des gènes exprimés entre des espèces présentant des croissances de la seconde et troisième paire de pattes nous permettra de mettre en évidence des gènes qui peuvent expliquer l'évolution de la croissance des pattes.

Les gènes candidats établis à l'aide du Chip-seq et de l'analyse transcriptomique comparative pourront être combinés afin de vérifier la robustesse des gènes sélectionnés. En effet si nous sommes en capacité de mettre en évidence les mêmes gènes candidats à l'aide de deux analyses indépendantes nous serons en capacité d'affirmer qu'il s'agit de candidats très robustes.

c. Etude de la croissance des pattes pendant le développement nymphal

Nous avons également démontré que certains des gènes testés ont un effet spécifique selon les segments de la patte, de plus la proportion des segments évoluent au cours du développement. Dans notre prochaine étude nous avons donc décidé de nous concentrer sur l'évolution de la taille des segments au cours du développement complet des Gerridae.

Il s'agit d'une étude d'allométrie ontogénique. L'allométrie permet de mettre en évidence des phénomènes de croissance différentielle entre différentes parties du corps. L'allométrie ontogénique concerne l'étude de caractères mesurés chez plusieurs individus à différents temps de son développement.

Pour notre étude il s'agit d'étudier la différence de croissance entre la seconde et troisième paire de pattes des Gerridae en prenant en compte la taille du corps. Dans ce but nous pourrions mesurer la taille des segments des pattes à chaque stade nymphal jusqu'au stade adulte. A l'aide de l'analyse de ces mesures nous serons capables de comprendre l'élongation des pattes au cours du development nymphal des individus. Nous pourrions ensuite comparer les courbes d'allométrie et d'élongation des segments entre les pattes pour comprendre comment la seconde paire de pattes atteint sa taille finale.

Cette étude nous permettra également d'établir à quel stade nymphal la croissance de la seconde paire de pattes est la plus importante. Nous pourrons ensuite à ce stade étudier les processus cellulaires associés à la croissance tels que l'apoptose et la division cellulaire.

Enfin nous pourrons également réaliser une étude permettant la comparaison de la croissance des pattes à différents stades entre différentes espèces, il s'agit d'allométrie phylogénétique. Dans cette expérience nous utiliserons différentes espèces présentant des plans d'organisation des pattes différents. La comparaison de la taille des pattes à différents stades chez plusieurs espèces nous permettra d'établir si la dynamique de croissance des pattes peut expliquer leur différence de taille de pattes entre ces espèces. On pourra définir l'échantillonnage des espèces à mesurer de façon à couvrir au maximum la phylogénie afin également d'établir des corrélations entre l'écologie des espèces et la taille de leurs pattes.

Chapitre B : Fonction et expression des gènes *svb, pri* et *Ubr3*

1. Introduction

Dans le précédent chapitre nous avons sélectionné le gène *ovo/shavenbaby* (*ovo/svb)* parmi notre liste de gènes candidats. Celui-ci est connu chez la Drosophile pour sa fonction somatique et germinale (Mével-Ninio *et al.,* 1995).
En effet *ovo/svb* est associé avec la formation de la lignée germinale *(ovo) (Oliver et al., 1990),* (Mevel-Ninio *et al.,* 1991) et est impliqué dans la différenciation de l'épiderme pour la formation de denticules appelées trichomes pour sa fonction somatique *(svb)* (Payre *et al.,* 1999).

Le réseau de gènes impliqué dans la fonction somatique *svb* a été étudié dans de nombreuses recherches et a notamment permis de mettre en évidence deux autres gènes indispensables à la formation des trichomes : *polished rice peptides (pri)* (Kondo *et al.,* 2007) , *ubiquitin protein ligase E3 (Ubr3)* (Zanet *et al.,* 2015). Ces deux gènes forment un complexe qui est responsable de la troncation de la protéine Svb qui initialement agit comme un répresseur de la formation des trichomes. La coupure de la protéine Svb au niveau de son domaine répressif va donc permettre à la protéine de devenir un activateur pour former les trichomes (Zanet *et al.,* 2015).

Etonnamment l'ARNi de *svb* chez *G. buenoi* nous a permis de mettre en évidence des défauts dans la segmentation de l'embryon suggérant que la fonction de *svb* est différente entre *D. melanogaster* et *G. buenoi*.

Nous proposons donc d'étudier la fonction et l'expression du gène *svb, pri* ainsi qu'*Ubr3* chez *G. buenoi* (Hemiptera) qui est une espèce ancestrale à la Drosophile (Diptera). Avec l'addition de données complémentaires sur d'autres espèces nous serons capables de définir quelle était la fonction ancestrale de ce réseau de gènes.

La mise en évidence de divergence de fonction de gènes tels que *svb*, inconnu pour une fonction segmentaire chez la Drosophile permettrait de mettre en lumière un gène insoupçonné pour une fonction aussi importante dans le développement. Cela pourrait donc nous aider à mieux comprendre comment la segmentation a évolué au sein des insectes.

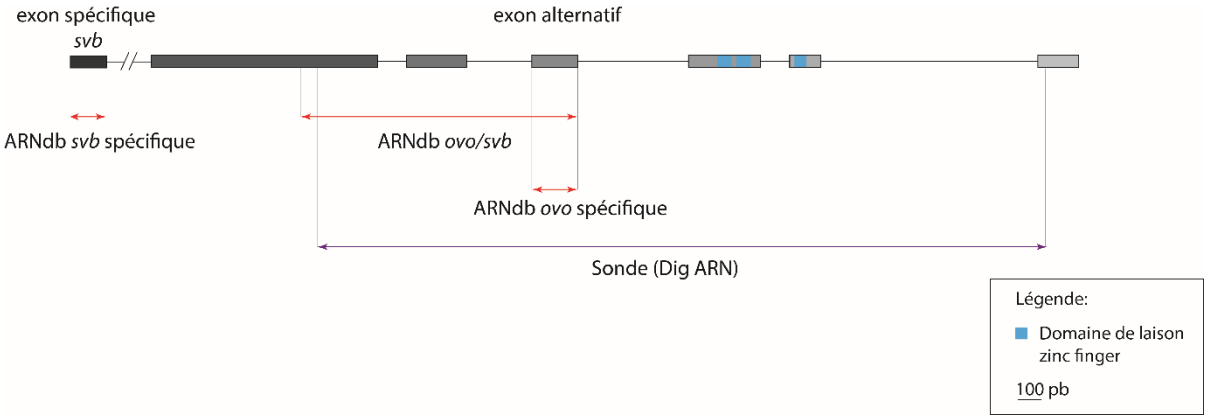


Figure 22 : Annotation de la séquence du gène *ovo/svb* de *G. buenoi*

Schéma correspondant à l'annotation du gène *ovo/svb*. L'annotation a été réalisée à l'aide de la séquence génomique de *G. buenoi* ainsi que de la séquence codante *d'ovo/svb* provenant du transcriptome de *G. buenoi*. L'annotation a également été vérifiée à l'aide de séquences homologues de *D. melanogaster.* La représentation schématique a été réalisée à l'échelle qui est indiquée dans la légende de la figure. Les jonctions entre les exons (rectangle gris) et les introns (traits noirs) ont été vérifiées à l'aide de séquençage de clone PCR du gène *ovo/svb* pour *G. buenoi*. Seul le premier intron (51539pb) n'est pas représenté pour une meilleure visibilité. Les domaines de liaison zinc finger ont été représentés en bleu. Enfin les emplacements des séquences complémentaires pour les ARNdb et la sonde ont été représentés par des flèches rouges pour l'ARNdb et violette pour la sonde.

Tableau 10 : Pourcentage des modifications observées pour *ovo/svb*^{ARNi} (100ng/µL ARNdb)

***ovo/svb*^{ARNi} _100 ng/µL (84% ARNi)**					
Phénotype	29/2/16 au 2/3/16	2/3/16 au 5/3/16	7/3/16 au 9/3/17	Total	Pourcentage phénotype
WT	7	0	0	7	16
Appendices fusionnés	3	11	3	17	40
Défauts segmentation A-P	0	10	9	19	44
Total d'embryon	10	21	12	43	100

Tableau 11 : Pourcentage des modifications observées pour exon spécifique *svb*^{ARNi} (100ng/µL ARNdb)

***svb*^{ARNi} _100 ng/µL (97% ARNi)**					
Phénotype	2/3/16 au 5/3/16	5/3/16 au 7/3/16	9/3/16 au 11/3/17	Total	Pourcentage phénotype
WT	3	0	0	3	3
Appendices fusionnés	18	2	7	27	26
Défauts segmentation A-P	17	30	26	73	71
Total d'embryon	38	32	33	103	100

Deux femelles ont été injectées indépendamment pour vérifier la répétabilité des phénotypes.
Le calcul des pourcentages de modifications dues à l'injection du double brin a été réalisé de la même manière que pour le chapitre A.
Le premier tableau présente les statistiques pour l'ARNi ciblant la séquence commune d'*ovo* et *svb* alors que le second tableau correspond seulement à l'ARNi ciblant *svb* au niveau du premier exon spécifique de la fonction somatique de *svb.*
Pour ces deux tableaux les WT correspondent aux embryons pour lesquels aucunes modifications morphologiques ou comportementales ne sont observées ; les appendices fusionnés correspondent aux embryons ayant des fusions aux niveaux des pattes, on peut également observer une transformation des pièces buccales en pattes ou en antenne. Ces embryons présentent aussi des défauts de spécification des segments thoraciques et/ou abdominaux. Les défauts de segmentation A-P (antéro-postérieur) définissent les embryons montrant les phénotypes les plus sévères, qui sont caractérisés par des défauts le long de l'axe antéro-postérieur et où la plupart des appendices sont manquants.
Pour chacune des injections nous obtenons des phénotypes *ovo/svb*^{ARNi} et *svb*^{ARNi} similaires et on observe un pourcentage de modification dû à l'ARNi très important avec 84% de modification observée pour *ovo/svb*^{ARNi} et 97% pour *svb*^{ARNi}.

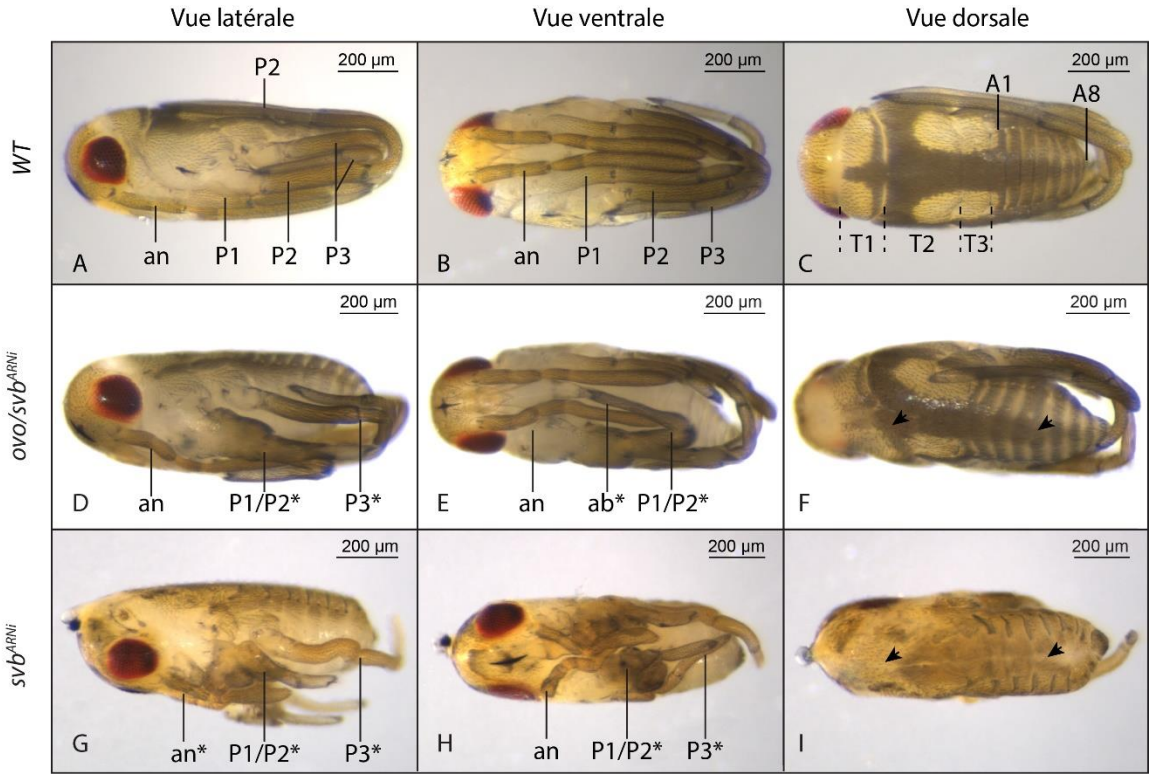


Figure 23 : ARNi du gène *ovo/svb*

Modifications observées après l'injection du double brin *ovo/svb*^{ARN} (D à F) et le double brin spécifique de l'exon *svb* (G à I) comparées à des embryons sauvages (*WT*) (A à C). Différentes vue latérales (A, D et G), ventrale (B, E, et H) et dorsales (C, F, et I) sont présentes pour une meilleure visualisation des modifications de l'ARNi. Les appendices qui paraissent modifiés avec des fusions ou des troncations sont représentés avec une étoile « * ».

Abréviations : an : antenne ; P1, P2 et P3 : pattes 1, 2 et 3 ; T1, T2, T3 : segments thoraciques 1, 2, et 3 ; ab : appendices buccaux

2. Résultats

a. Fonction de *pri, svb* et *UBR3* chez *G. buenoi*

❖ Fonction de *ovo/svb*

Pour découvrir la fonction *d'ovo/svb* chez *G. buenoi* au cours du développement embryonnaire, nous avons procédé à l'inactivation *d'ovo/svb* par ARNi. À cette fin, nous avons injecté des femelles avec trois ARNdb distincts. Le premier d'entre eux ciblant l'exon 2 à l'exon 4 qui correspondent à la fonction ovarienne *(ovo)* et somatique *(svb)* de *ovo/svb* chez la *Drosophile* (Fig.22). Le second ARNdb est spécifique de l'exon 1 qui est responsable de la fonction somatique *(svb)* chez la Drosophile (Fig.22). Finalement le dernier ARNdb a pour cible l'exon alternatif 4 qui est lui spécifique de la fonction ovarienne *(ovo)* (Fig.22).

L'ARNi spécifique d'*ovo* a entraîné l'absence de modification visible durant le développement embryonnaire. Cependant les femelles obtenues à partir de l'injection maternelle semblent devenir stériles une fois devenues adultes. Sur vingt femelles au total certaines ont pondu quelques œufs (soixante en un mois pour les vingt femelles) mais très peu comparé à des femelles sauvages (plusieurs centaines par femelle en un mois). De plus aucun de ces embryons n'est parvenu à se développer. Enfin la dissection de plusieurs femelles a révélé l'absence totale d'ovarioles ce qui explique pourquoi très peu d'œufs ont été pondus sur la totalité des femelles.
Ce résultat suggère que la fonction *d'ovo* dans la lignée germinale était déjà présente pour les Hemiptères et elle est conservée pour les Diptères.

L'inactivation de *svb* lors de l'embryogenèse a entraîné des défauts de développement considérables (Fig.23). Les niveaux de sévérité des modifications dues à l'ARNi se sont cependant révélés très variables, c'est pourquoi nous avons injecté différentes concentrations d'ARNdb allant de 0.1ng/L à 1µg/µL (données non présentées). Nous avons établi que pour une concentration de 100ng/µL nous parvenions à obtenir des modifications en proportion significative (84 et 97%) et qui recouvrait la totalité des sévérités obtenues pour les autres concentrations d'ARNdb ; c'est pourquoi nous présenterons les phénotypes observés pour svb^{ARNi} à cette concentration (Tab.10-11), (Fig.23).

Les ARNdb ciblant la séquence de l'exon spécifique *svb* (Fig.23-D à F) et la partie commune *d'ovo/svb* (Fig.23-G à I) ont permis d'obtenir les mêmes phénotypes, affectant le développement de l'embryon contrairement à l'ARNdb spécifique de la fonction *d'ovo*. Ceci signifie qu'en ciblant cette partie du gène *ovo/svb* on cible bien la fonction somatique de *svb*.

A 100ng/µL nous obtenons environ la moitié des embryons ayant des fusions au niveau des pattes (Fig.23-D à I). Ces fusions sont le plus souvent accompagnées par l'absence d'un ou plusieurs segments thoraciques. Des embryons qui présentent une fusion de la première et seconde paire de pattes n'ont pas de premier segment thoracique spécifié. Ceci suggère que la fusion de la première et de la seconde paire de pattes est la conséquence de l'absence de spécification du premier segment thoracique.

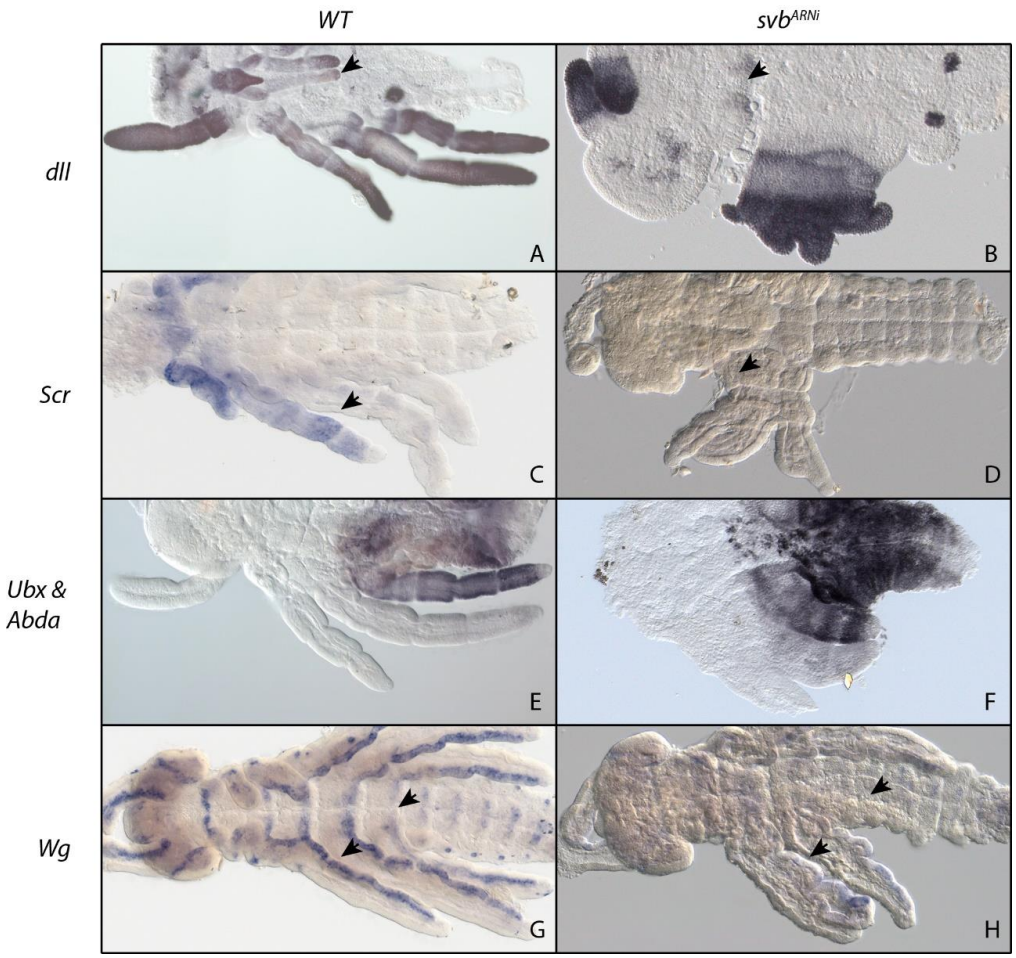


Figure 24 : Marquages de gènes impliqués dans la segmentation chez des embryons *svb*^{ARNi}
Modification due à l'ARNi *d'ovo/svb* mis en évidence à l'aide de marquages. Marquage Immunocytologique de *dll (A-B)*, *Ubx* et *Abda (E-F)* ; et HIS de *Scr* (C-D) et *Wg* (G-H) sur des embryons *svb*^{ARNi} (B, D, F et H) comparé aux embryons sauvages (*WT*) (A, C, E et G). Les flèches mettent en évidence les changements de marquage entre la condition *WT* et la condition *svb*^{ARNi}.

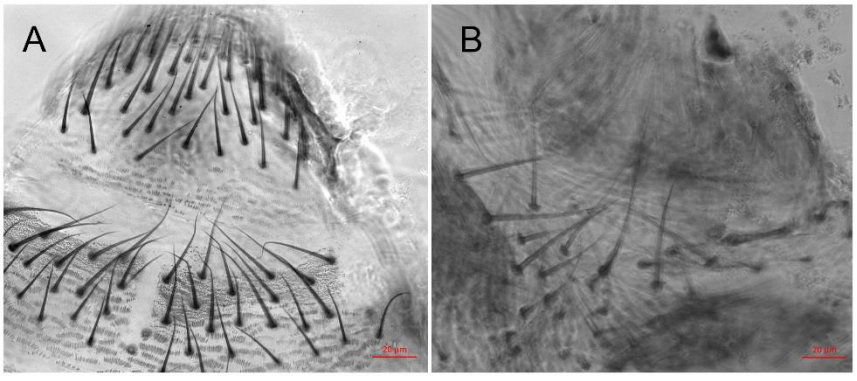


Figure 25 : Malformation de la cuticule pour les embryons svb^{ARNi}
Photos au microscope (échelle 20µm) présentant les trichomes et la cuticule altérés pour svb^{ARNi} (B) comparé au WT (B).

Dans d'autres cas la totalité des segments thoraciques ne sont pas spécifiés de ce fait toutes les pattes sont fusionnées. Ces embryons semblent également présenter des segments abdominaux mal formés avec une fermeture dorsale incomplète (Fig.23-F-I). La tête parait également anormale avec des yeux de taille et de forme irrégulière. Enfin les pièces buccales sont souvent absentes, malformées ou fusionnées tout comme les antennes (Fig.23-E-H).

L'autre moitié des embryons observés sont extrêmement affectés seule la partie antérieure de l'embryon semble se former, les segments antéro-postérieurs ne sont pas spécifiés et presque tous absents (semblable à *pri*^{ARNi} et *Ubr3*^{ARNi}, Figs.26-28).

Pour mieux caractériser les modifications observées sur les embryons *svb*^{ARNi}, nous avons décidé de réaliser des marquages de gène segmentaire pour ces embryons (Fig.24). Pour cela nous avons utilisé des embryons ayant subis des modifications telles que des fusions aux niveaux des pattes mais où la plupart des segments antéro-postérieurs avaient été spécifiés. Différents marquages ont été réalisés à l'aide de sondes et d'anticorps reconnaissant des gènes exprimés le long de l'axe antéro-postérieur et dans les appendices. Pour cela nous avons choisi cinq gènes distincts : *Sex-comb reduced (Scr), distal less (dll), Ultrabithorax (Ubx), Abdominal-A (Abda) et wingless (Wg).*

Scr est normalement exprimé dans le premier segment thoracique ainsi que la première paire de pattes et les pièces buccales (Fig.24-A). Un marquage de *Scr* sur des embryons *svb*^{ARNi} présentant des fusions au niveau de la première et seconde paire de patte à révélé une absence totale de marquage dû à l'absence de ceux-ci (Fig.24-B).
L'absence des pièces buccales a également été mise en évidence par *dll* qui normalement est présent dans tous les appendices et les pièces buccales (Fig.24-A-B).

Les marquages *d'Ubx* et *d'Abda* n'ont pas montré de différences en absence de *svb* bien que toutes les pattes étaient fusionnées (Fig.24-E-F). Ceci suggère que l'identité de la patte deux et trois est peut-être conservée malgré la fusion des pattes.

Enfin *Wg* est un gène qui est présent dans la partie postérieure des segments et des appendices, en absence de *svb* l'expression de *Wg* est gravement affectée et presque absente ce qui suggère que la polarité des segments est sévèrement affectée (Fig.24.G-H).

Finalement la fonction de *svb* chez la Drosophile étant associée à la formation de trichomes dans la cuticule des larves, nous avons également vérifié si cette fonction était conservée chez *G. buenoi.* Nous avons donc comparé la cuticule des embryons tardifs sauvages avec des embryons *svb*^{ARNi} et nous avons constaté que des rangées importantes de structures semblables à des denticules trouvées dans les embryons sauvages étaient manquantes dans les embryons de *svb*^{ARNi} (Fig.25). Cependant la sévérité des phénotypes dans la segmentation antéro-postérieure a gravement affecté le développement des embryons et de leurs cuticules. Il est donc difficile d'être sûr que *svb* est directement associé à la formation des trichomes, néanmoins la formation des trichomes par l'intermédiaire de *svb* est peut-être déjà présente chez les insectes semi-aquatiques.

Tableau 12 : Pourcentage des modifications observées pour *pri*^{ARNi} (100ng/µL ARNdb)

***pri*^{ARNi}_100 ng/µL (61% ARNi)**				
Phénotype	13/9/16 au 19/9/16	19/9/16 au 26/09/16	Total	Pourcentage phénotype
WT	44	5	49	39
Défauts ap + segmentation A-P	22	27	49	39
Défauts segmentation A-P	27	1	28	22
Total d'embryon	93	33	126	100

Tableau 13 : Pourcentage des modifications observées pour *pri*^{ARNi} (10ng/µL ARNdb)

***pri*^{ARNi}_100 ng/µL (84% ARNi)**		
Phénotype	13/9/16 au 19/9/16	Pourcentage phénotype
WT	7	16
Défauts ap + segmentation A-P	21	49
Défauts segmentation A-P	15	35
Total d'embryon	43	100

Trois femelles ont été injectées indépendamment pour vérifier la répétabilité des phénotypes.
Le calcul des pourcentages de modifications dues à l'injection du double brin a été réalisé de la même manière que les ARNi précédent. Deux femelles ont été injectées indépendamment pour vérifier la répétabilité des phénotypes. Pour ces deux tableaux les phénotypes sont similaires à ceux décrit pour les tableaux d'*ovo/svb.*

Pour chacune des injections nous obtenons des phénotypes *pri*^{ARNi} similaires et on observe un pourcentage de modification dû à l'ARNi très important avec 61% de modification observée pour la première injection et 84% pour la seconde injection.

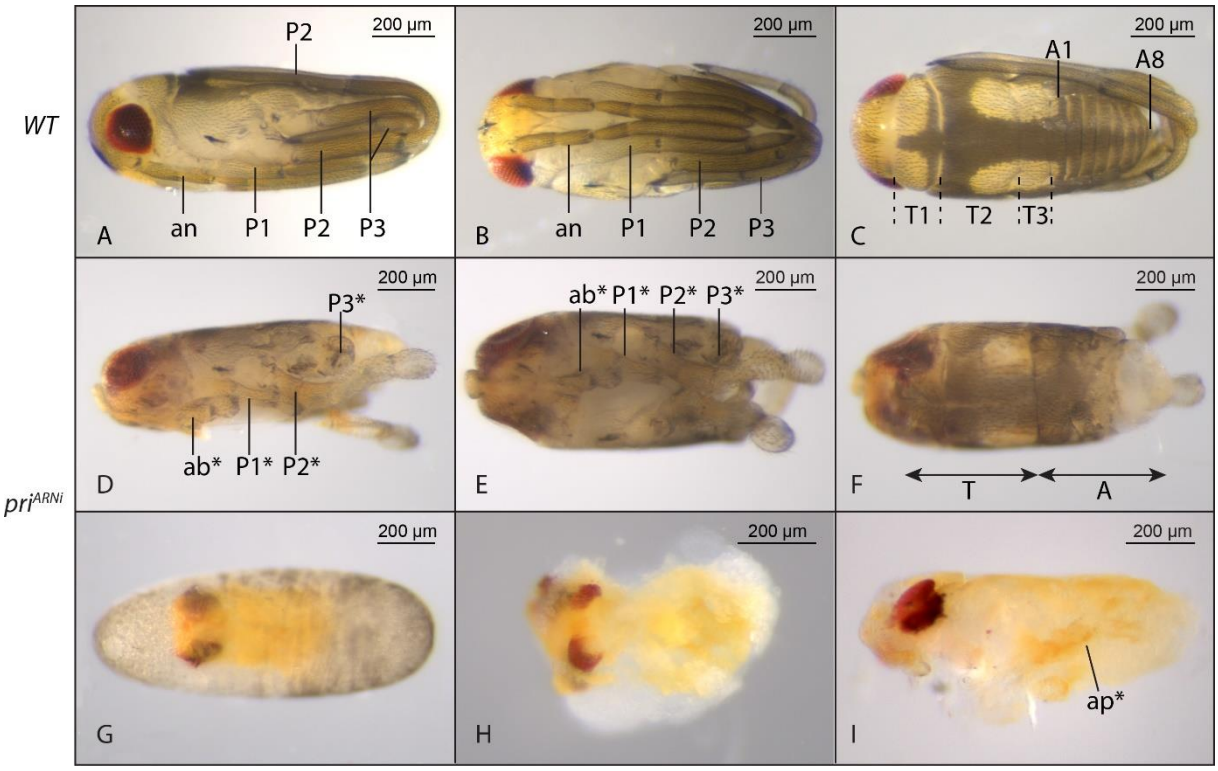


Figure 26 : ARNi du gène *pri*

Modifications observées après l'injection du double brin *pri* (D à I) comparées à des embryons sauvages (*WT*) (A à C). Différentes vue latérales (A, D et I), ventrales (B, E, G et H) et dorsales (C-F) sont présentes pour une meilleure visualisation des modifications de l'ARNi. Différentes sévérités de modifications sont présentées avec des embryons présentant des malformations au niveau des appendices (D à F) et des défauts antéro-postérieurs (F) qui sont probablement à l'origine de ces malformations. Pour les phénotypes les plus sévères on observe des embryons très réduits où la plupart des segments thoraciques, abdominaux et les appendices sont absents (G, H et I). Les appendices qui paraissent modifiés avec des fusions ou des troncations sont représentés avec une étoile « * ».

Abréviations : an : antenne ; P1, P2 et P3 : pattes 1, 2 et 3 ; T1, T2, T3 : segments thoraciques 1, 2, et 3 ; ab : appendices buccaux ; ap : appendice

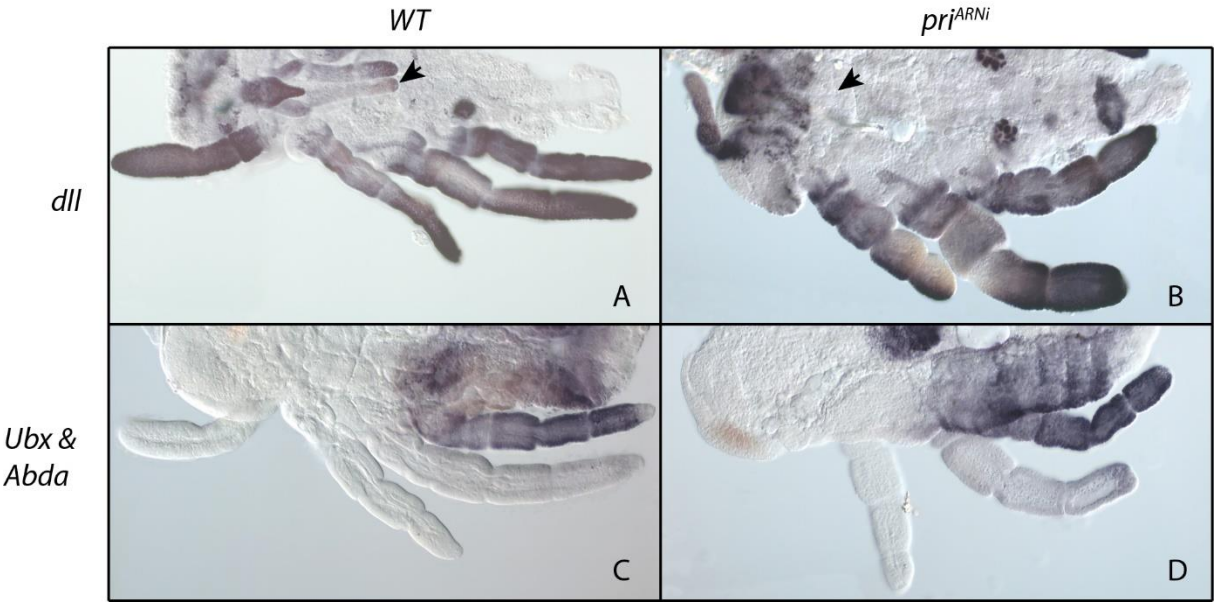


Figure 27 : Marquages *dll, Ubx* et *Abda* sur *pri*^{ARNi}

Modification due à l'ARNi de *pri* mise en évidence à l'aide de marquages. Marquages immunocytologiques de *dll*, *Ubx* et *Abda* sur des embryons *pri*^{ARNi} sur les photos à droite de la figure comparé aux marquages immunocytologiques réalisés sur des embryons sauvages (*WT*) sur les photos à gauche de la figure. Les flèches mettent en évidence les changements de marquage entre la condition *WT* et la condition *pri*^{ARNi}.

❖ Fonction de *pri*

Afin de tester si la fonction de développement de *pri* observée chez la Drosophile ou d'autres espèces telles que *T. castaneum* (Savard *et al.,* 2006) est spécifique de ces espèces nous avons testé la fonction de *pri* chez *G. buenoi* (Fig.26). Cela nous permettra de determiner si cette fonction est conservée chez les espèces ancestrales à la Drosophile.

L'injection de l'ARNdb du gène *pri* chez *G.buenoi* a entrainé des modifications très sévères durant le développement tel qu'à 1µg/µL presque tous les embryons ne se développent pas. Cependant avec une concentration d'ARNdb à 100ng/µL la plupart des embryons parviennent à se développer bien que leurs segments antéro-postérieurs ne soient pas bien spécifiés (Tab.12-13). A cette concentration 61% et 84% des embryons présentent des phénotypes anormaux pour deux femelles indépendantes. Cela suggère que l'ARNi a bien fonctionné.

La majorité des embryons pri^{ARNi} ne nous permet pas de distinguer les différents segments thoraciques et abdominaux bien que l'on semble apercevoir la distinction entre le thorax et l'abdomen (Fig.26-F). Sur ces embryons nous pouvons également observer des malformations dans les appendices (antennes, pièces buccales et pattes) avec de possible transformation cependant la plupart des appendices sont en partie manquants (Fig.26-D-F).
Par exemple les jonctions entre les pattes semblent difficiles à distinguer, les appendices sont très courts et sont arrondis à leurs extrémités, les poils sont en faible densité et semblent très court (Fig.26-D-E). De plus les pièces buccales sont très souvent absentes, lorsqu'elles sont présentes elles sont souvent partiellement formées et elles ressemblent étrangement à des antennes qui elles sont très souvent absentes (Fig.26-D).

Les embryons les plus affectés présentent aussi de graves problèmes de segmentation antéro-postérieure où aucun des segments ne parait correctement spécifié (Fig.26-G à I). De plus ces embryons paraissent très clairs et parfois très transparents ce qui laisse penser à des défauts de formation de la cuticule (Fig.26-G à I). Si celle-ci est réellement malformée cela pourrait expliquer pourquoi aucun poil n'est visible sur le corps et les pattes (Fig.26-G à I). Enfin pour ces embryons la quasi-totalité des appendices sont absents (Fig.26-I). Les antennes et les pièces buccales ne se développent jamais. Les appendices présents sont quant à eux partiellement développés, ils sont de ce fait très peu visibles, à tel point qu'il est impossible de déterminer de quel appendice il s'agit (Fig.26-I).

Pour mieux caractériser les modifications observées sur les embryons pri^{ARNi}, nous avons décidé de réaliser des marquages de ces embryons. Pour cela nous avons utilisé des embryons ayant subi des malformations aux niveaux des pattes ou des appendices mais où la plupart des segments antéro-postérieurs avaient été spécifiés. Différents marquages ont été réalisés à l'aide d'anticorps reconnaissant *dll, Ubx et Abda.*

Le marquage *d'Ubx* et *Abda* n'a révélé aucune modification en absence de *pri* (Fig.27-C-D). Cependant l'absence des pièces buccales a été mise en évidence par *dll* qui normalement est présent dans tous les appendices et les pièces buccales (Fig27-A-B).

Tableau 14 : Pourcentage des modifications observées pour *Ubr3*^{ARNi} (5ng/µL ARNdb)

Ubr3^{ARNi}_5ng/µL (86% ARNi)				
Phénotype	13/9/16 au 19/9/16	19/9/16 au 26/9/16	Total	Pourcentage phénotype
WT	7	1	8	14
Défauts ap + segmentation A-P	41	8	49	83
Défauts segmentation A-P	2	0	2	3
Total d'embryon	50	9	59	100

Deux femelles ont été injectées indépendamment pour vérifier la répétabilité des phénotypes.
Le calcul des pourcentages de modifications dues à l'injection du double brin a été réalisé de la même manière que pour *pri*^{ARNi}. La classification des différents défauts correspond à la même que pour *pri*^{ARNi}.
Pour l'injection on observe un pourcentage de modification dû à l'ARNi très important avec 86% de modification observée pour une injection à 5ng/µL.

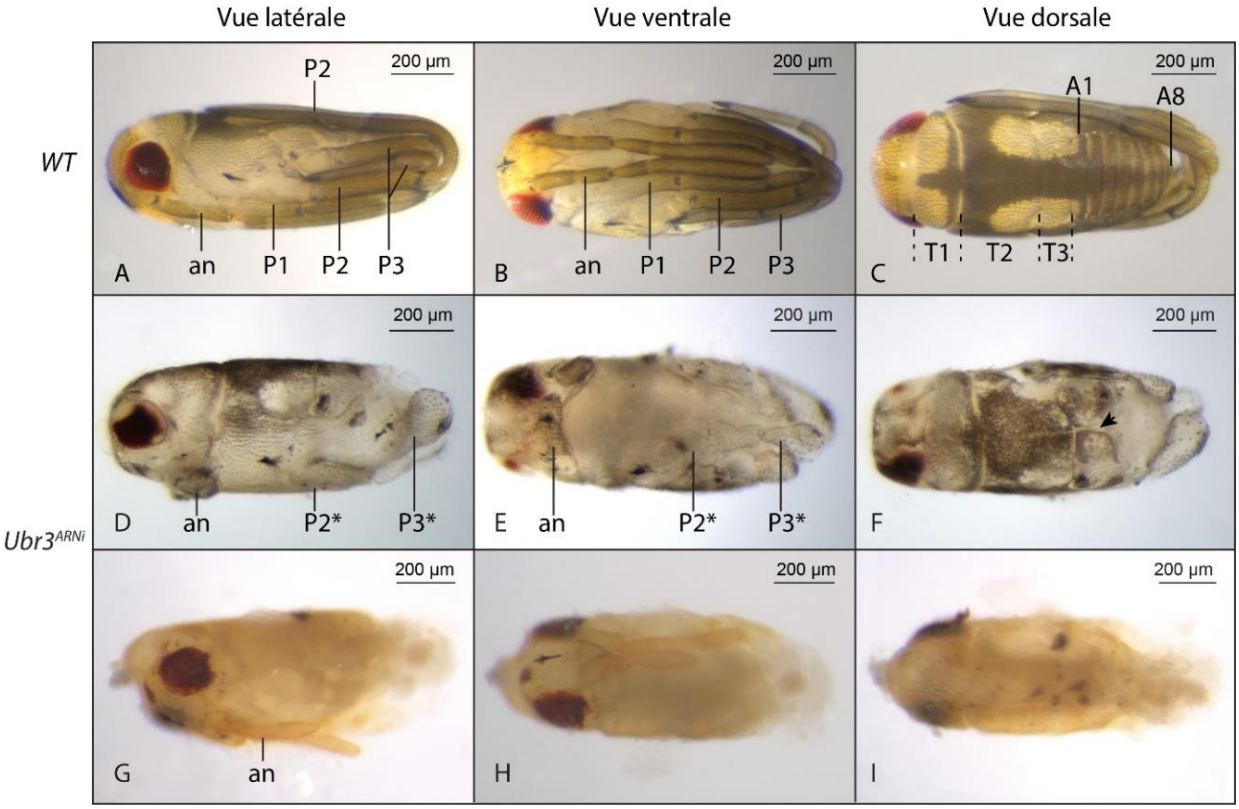


Figure 28 : ARNi du gène *Ubr3*

Modifications observées après l'injection du double brin *Ubr3* (D à I) comparées à des embryons sauvages (*WT*) (A à C). Différentes vues, latérale (A, D et G), ventrale (B, E, et H) et dorsale (C, F, et I) sont présentes pour une meilleure visualisation des modifications de l'ARNi. Différentes sévérités de modifications sont présentées avec des embryons présentant des malformations au niveau des appendices (D à F) et des défauts antéro-postérieurs (F) qui sont probablement à l'origine de ces malformations. Pour les phénotypes les plus sévères on observe des embryons très réduits où aucun des segments thoraciques et abdominaux ne sont visibles et seulement les antennes sont présentes (G, H et I). Les appendices qui paraissent modifiés avec des fusions ou des troncations sont représentés avec une étoile « * ».

Abréviations : an : antenne ; P1, P2 et P3 : pattes 1, 2 et 3 ; T1, T2, T3 : segments thoraciques 1, 2, et 3 ; ab : appendices buccaux

❖ Fonction *d'Ubr3*

Afin de vérifier si une potentielle interaction est possible entre *pri* et *Ubr3* chez *G. buenoi* nous avons vérifié si la fonction *d'Ubr3* est similaire. Si ces deux gènes présentent des fonctions similaires nous serons capables de montrer indirectement que l'interaction entre *pri* et *Ubr3* est potentiellement conservée.

La diminution de l'expression *d'Ubr3* par ARNi a permis de mettre en évidence des phénotypes de létalité pour la plupart des concentrations d'ARNdb utilisées. Cependant pour une concentration d'ARNdb à 5ng/µL nous sommes parvenus à observer des embryons montrant des défauts de développement en plus des phénotypes de létalité (Tab.20). Les défauts de développement sont représentés en nombre conséquent (86%) ce qui suggère que l'ARNi a bien fonctionné.

L'ARNi *d'Ubr3* a provoqué des défauts très similaires à ceux observés pour *pri* (Fig.28). En effet les embryons $Ubr3^{ARNi}$ présentent des défauts de segmentation antéro-postérieurs où la plupart des segments ne sont pas spécifiés avec certains embryons qui montrent des problèmes de fermeture dorsale (Fig.28-F). Ces défauts de segmentation entrainent l'absence de certains appendices comme les pattes, les pièces buccales et les antennes (Fig.28-D-E).

Tout comme pour les embryons pri^{ARNi} les embryons les plus sévères $d'Ubr3^{ARNi}$ entrainent la disparition de tous les segments antéro-postérieurs tel que presque aucun appendice ne parvient à se former (Fig.28-G à I).

La fonction commune observée pour *pri, Ubr3* et *svb* suggère que ces trois gènes interagissent probablement entre eux comme chez la *Drosophile*. Cependant la fonction de ses trois gènes semble impliquée dans la segmentation des embryons contrairement à la Drosophile.

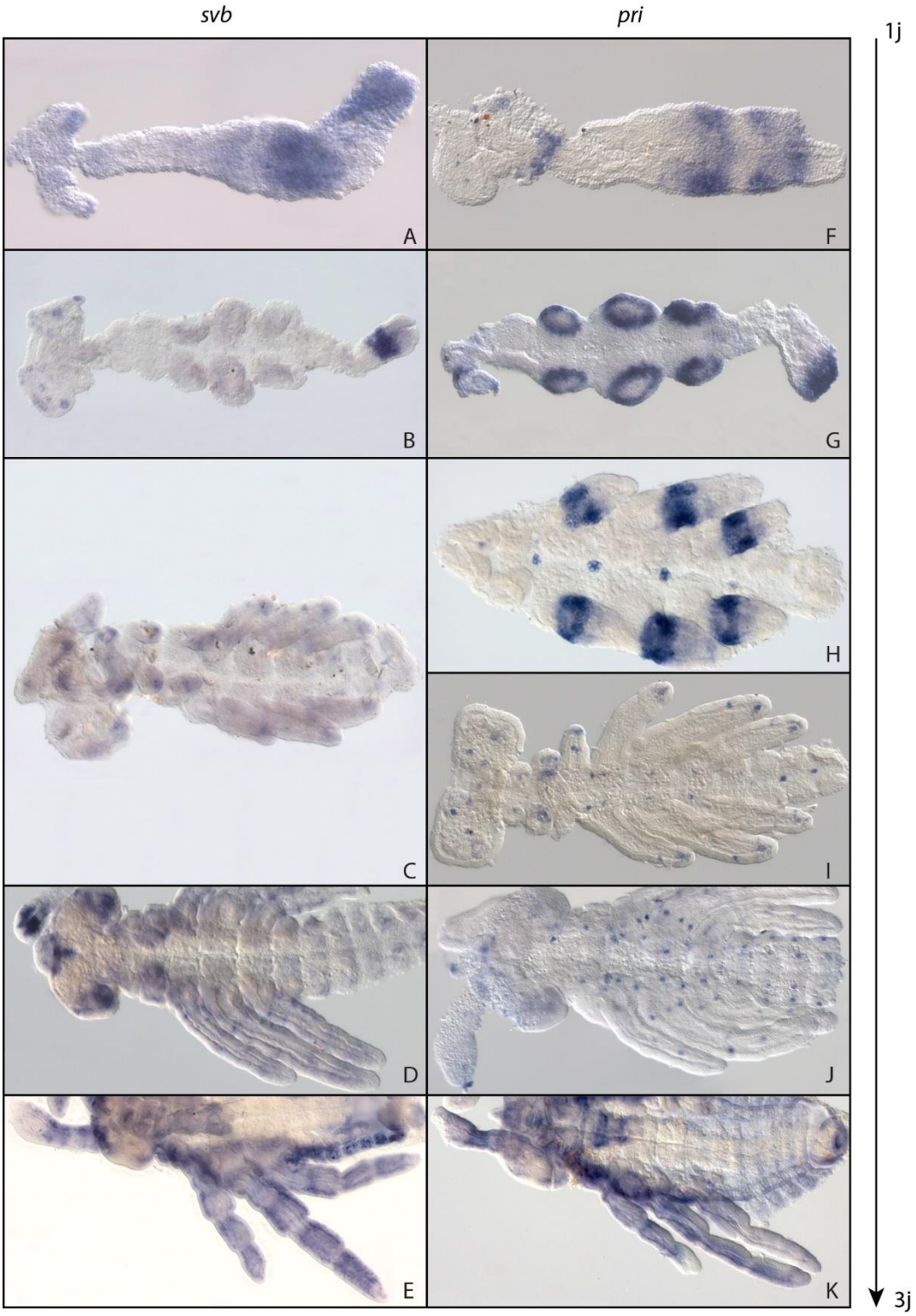


Figure 29 : Hybridation in situ des gènes *svb* et *pri*

HIS de *svb* dans la colonne de gauche, (A à E) et *pri* dans colonne de droite, (F à K) sur des embryons sauvages (*WT*) à des stades similaires. Plusieurs stades du développement embryonnaire sont représentés afin de mettre en évidence le patron d'expression dynamique de *svb* et *pri.*

b. Expression *pri, svb* et *UBR3* chez *G. buenoi*

❖ Expression *ovo/svb* chez *G. buenoi*

L'expression de *ovo/svb* a été examinée à l'aide d'une hybridation in-situ (HIS) à différents stades recouvrant approximativement tous les stades que nous sommes capables de marquer par in-situ (avant la formation de la cuticule).

Tôt durant l'embryogénèse avant que les appendices ne se forment mais lorsque l'axe antéro-postérieur est déjà spécifié, on remarque *qu'ovo/svb* est exprimé dans la totalité de l'embryon et plus particulièrement au niveau postérieur avec deux bandes (Fig.29-A).

Plus tard lorsque les segments thoraciques sont spécifiés, lors de l'addition des segments abdominaux et où les bourgeons des pattes sont apparents on remarque qu'*ovo/svb* est exprimé en une bande postérieure (Fig.29-B). Celle-ci est très forte et parait située dans la zone de croissance de l'embryon (Fig.29-B). A ce stade on distingue également des spots d'expression dans la tête, localisés à l'emplacement des futurs yeux et des antennes (Fig.29-B).

Lorsque tous les segments antéro-postérieurs sont formés ainsi que les pattes, l'expression de *ovo/svb* devient plus diffuse dans la totalité de l'embryon, y compris dans la tête et les appendices. Néanmoins on peut distinguer plusieurs spots d'expression toujours localisés dans la tête mais aussi au niveau des segments des mandibules, des maxillaires, du labium et dans la partie distale des pattes (Fig.29-C).

Après l'élongation des appendices et lorsque les antennes sont formées, le patron d'expression de *ovo/svb* persiste et semble assez similaire au stade précédent. Cependant les spots d'expression sont plus nombreux dans les pattes et des bandes d'expression semble apparaitre dans les pattes (Fig.29-D). L'expression dans la tête reste présente mais apparait très forte au niveau des yeux ainsi que dans la partie distale des antennes.

Enfin juste avant la déposition de la cuticule lorsque tous les appendices sont bien formés et allongés, l'expression d'*ovo/svb* dans les pattes devient très intense sauf au niveau des jonctions des segments des pattes (Fig.29-E). L'expression dans le corps devient plus localisée dans la périphérie de celui-ci et l'expression dans les yeux disparait. Au niveau des antennes et des pièces buccales *ovo/svb* devient plus exprimé dans la partie proximale où plusieurs bandes d'expressions semblent visibles (Fig.29-E).

L'expression d'*ovo/svb* évolue donc tout au long de l'embryogénèse bien qu'elle reste localisée dans les mêmes zones de l'embryon. Ce patron dynamique d'expression suggère *qu'ovo/svb* joue un rôle crucial pendant l'embryogenèse, y compris au niveau de la segmentation antéro-postérieure. En effet on peut distinguer *ovo/svb* au niveau de la zone de croissance primordiale pour la segmentation antéro-postérieure des insectes short-germ band. Enfin l'expression d'*ovo/svb* persiste même après l'ajout de tous les segments et reste très souvent localisée dans les appendices et les pièces buccales ce qui suggère qu'il doit être très important pour leurs développements.

❖ Expression de *pri* chez *G. buenoi*

Tout comme pour *svb* l'in-situ de *pri* a permis de mettre en évidence un patron d'expression de type segmentaire qui évolue au cours du développement.

Tout d'abord, au stade le plus jeune testé, après la spécification antéro-postérieure et avant que les appendices ne soient formés, *pri* est exprimé sous la forme de deux ou trois bandes du côté postérieur de l'embryon de manière similaire au gène de type gap (Fig.29-F). A ce stade nous distinguons également l'expression dans le segment où se développeront les maxillaires (Fig.29-F).

Plus tard lors de la formation des bourgeons des pattes et lors de l'ajout des segments abdominaux *pri* est présent en bandes dans les pattes et dans la zone de croissance de l'embryon (Fig.29-G), cette expression s'intensifiera au cours de la croissance des pattes (Fig.29-H).
Peu après ce stade des spots d'expression commencent à apparaitre au niveau des appendices et du corps pour ensuite apparaitre dispersés dans la totalité de l'embryon (Fig.29-I-J).

Tard dans l'embryogénèse lorsque tous les appendices sont formés et allongés les spots d'expression observés précédemment, deviennent plus localisés dans l'abdomen de l'embryon. Ceux-ci disparaissent ensuite progressivement pour laisser place à un patron d'expression plus diffus. L'expression de *pri* est alors localisée dans les antennes, les pattes, les pièces buccales, la tête et l'abdomen. De plus de légères bandes d'expression sont également présentent dans les antennes, les pièces buccales et l'abdomen (Fig-29-K).

L'expression de *pri* est très concordante avec les différents défauts observés pour les embryons ARNi du fait que son expression est présente dans les tissus où les nombreuses malformations ont été observées. D'autre part l'expression de *pri* est extrêmement dynamique ce qui corrèle avec le nombre important de modifications observées en absence de *pri.*

❖ Comparaison de l'expression de *pri* et *svb* chez *G. buenoi*

Nous avons précedement montré des fonctions très similaires pour *pri* et *svb,* ce qui suggère qu'ils interagissent peut-être comme chez la Drosophile. Les expressions de *pri* et *svb s*emblent très complémentaires et très similaires ce qui conforte grandement cette hypothèse. Néanmois, bien que les patrons d'expression de *pri* et *svb* semblent très proches, ils ne semblent pas toujours se chevaucher.

Par exemple, pour les deux premiers stades testés on peut observer l'expression de *pri* et *svb* en plusieurs bandes segmentaires du côté postérieur de l'embryon. Cependant ces bandes d'expression observées ne semblent pas se superposer. Ce qui suggère que si *pri* régule *svb* comme chez la Drosophile, il devrait être capable de diffuser dans l'embryon dans ce but.

Plus tard dans le développement l'expression de *pri* et *svb* sont pratiquement identiques, à ce stade de l'embryogenèse, *pri* et *svb* ont peut-être besoin d'être exprimés dans le même tissu pour pouvoir interagir ensemble.

Malgré cela il faudrait réaliser un marquage de ces deux gènes sur le même embryon pour vérifier ces hypothèses de manière à être sûr qu'il s'agit du même stade et que les expressions sont bien comparables. Enfin toutes ces données réunies nous permettent de penser que ces deux gènes interagissent surement entre eux.

❖ Expression *d'Ubr3* chez *G. buenoi*

La plupart des stades testés pour *l'in-situ* n'ont révélé aucune expression malgré la présence de ce gène à ces stades dans les données transcriptomiques. Néanmoins certains stades ont révélé une légère expression ubiquitaire. Ceci suggère qu*'Ubr3* est exprimé trop faiblement pour être détecté par *in-situ*, cependant les modifications induites par ARNi précédemment décrites confirment *qu'Ubr3* est bien exprimé pendant l'embryogénèse.

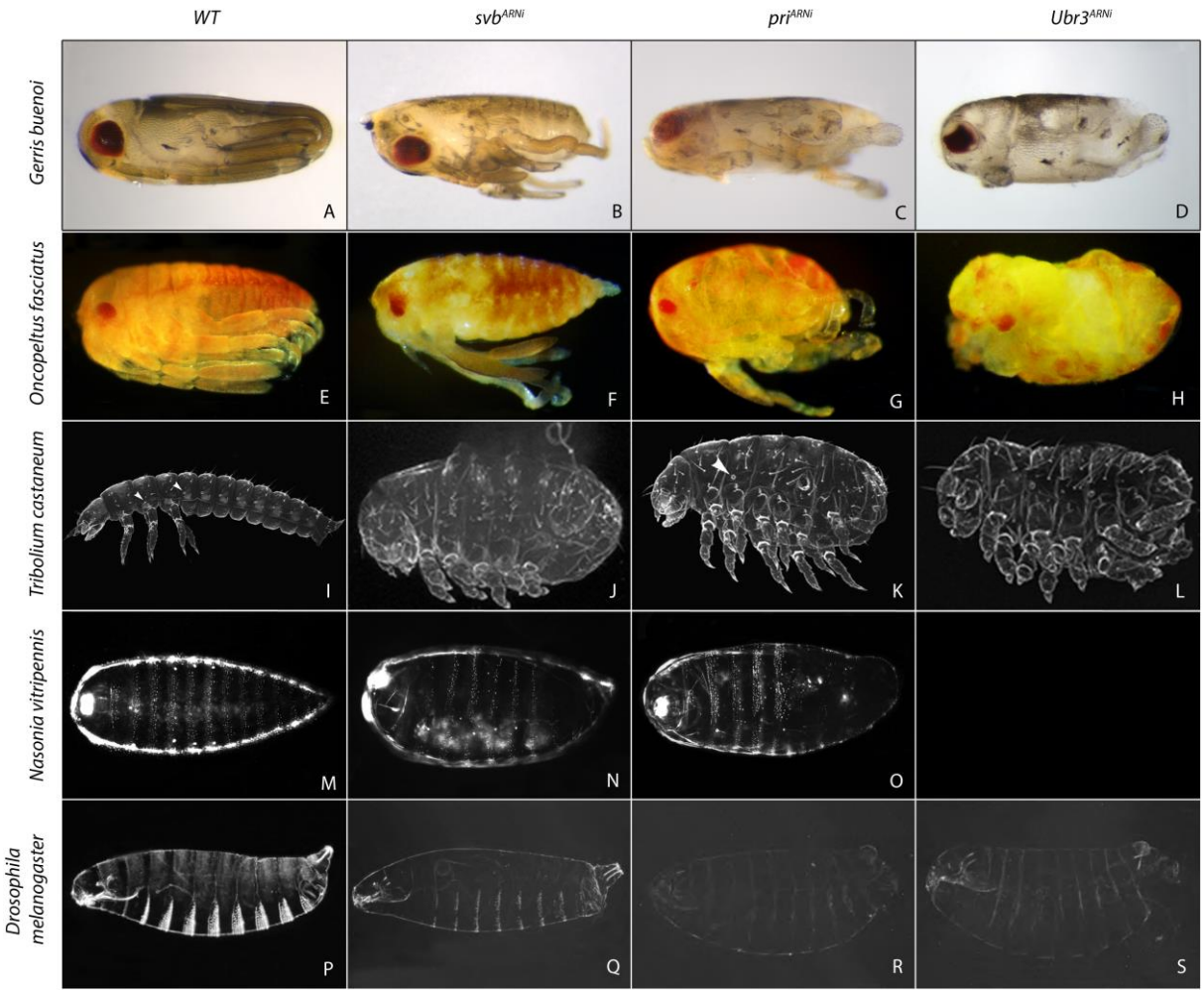


Figure 30 : Récapitulatif de la fonction des gènes *svb, pri* et *Ubr3* chez les cinq espèces étudiées

Fonction de *svb*, *pri* et *Ubr3* comparée à des embryons sauvages pour *G. buenoi* (A à D), *O. fasciatus* (E à H), *T. castaneum* (I à L), *N. Vitripennis* (M à 0) et *D. melanogaster* (P à S). Un embryon est présent pour chaque phénotype ARNi pour chaque espèce. Les phénotypes présentés sont de sévérité similaire afin de pouvoir comparer la fonction de chaque gène pour les cinq espèces présentes. Les photos *WT* et *pri*^{ARNi} de *T. castaneum* sont issues de (Savard *et al.,* 2006), les autres photos de *T. castaneum* sont issues des résultats de Suparna Ray et Martin Klinger. Les résultats de *N. Vitripennis* et *O. fasciatus* ont été réalisés par Miriam Rosenberg, ceux de *D. melanogaster* ont été réalisés par Hélène Chanut et François Payre.

c. Fonction de *pri, svb* et *Ubr3* pour d'autres espèces

La fonction et l'expression de *pri, svb* et *Ubr3* ont été testées chez d'autres espèces afin de vérifier si les résultats obtenus pour *G. buenoi* étaient similaires.

Chez une espèce apparentée *O. fasciatus* (Hemiptera) nous avons observé des résultats identiques à ceux obtenus pour *G.buenoi*. L'ARNi de *pri, svb* et *Ubr3* montre des modifications des appendices identiques avec l'absence de spécification de certains segments antéro-postérieurs (Fig.30-E à G). De la même manière que pour *G. buenoi* les phénotypes les plus sévères de l'ARNi pour ces trois gènes provoquent des défauts de segmentation très sévères avec l'absence des segments thoraciques et abdominaux ainsi que les appendices (Fig.30-E à G).

Pour *T. castaneum* (Coleoptera) et *N. vitripennis* (Hymenoptera) par rapport à *O. fasciatus* et *G. buenoi,* présentent des fonctions de *pri, svb* et *Ubr3* similaires avec une réduction du nombre de segments antéro-postérieurs (Fig.30-I à O). Cependant chez *Tribolium* nous pouvons observer que les phénotypes svb^{ARNi}, pri^{ARNi} et $Ubr3^{ARNi}$, les plus sévères présentent des pattes additionnelles au niveau des segments abdominaux.

Les phénotypes ARNi pour les gènes *svb*, *pri* et *Ubr3* observés chez *G. buenoi, O. fasciatus, T. castaneum* et *N. Vitripennis*, les quatre espèces ancestrales à *D. melanogaster,* présentent donc tous des fonctions associées à la segmentation antéro-postérieure de l'embryon (Fig.30).

Chez la Drosophile il a été démontré que *pri* possède des fonctions impliquées dans le développement, communes à celle précédemment décrites, comme la formation de la cuticule et la formation des pattes *(Galindo et al., 2007), (Pueyo and Couso, 2008)*. Néanmoins tous les segments antéro-postérieurs semblent spécifiés chez la Drosophile en absence de pri contrairement aux autres espèces (Fig.30-R). Les phénotypes $Ubr3^{ARNi}$ sont eux très similaire à pri^{ARNi} (Fig.30-S), ce qui est concordant avec la fonction *d'Ubr3* avec *pri.*
D'autre part les fonctions observées pour svb^{ARNi} ont permis de montrer des défauts au niveau des pièces buccales (données non montrées) et de la taille du telson (dernier segment abdominal) de la Drosophile cependant aucun segment antéro postérieur ne semble absent (Fig.30-Q).

Il semblerait donc que la fonction de *svb, pri,* et *Ubr3* semble en partie conservée entre les espèces testées qui sont ancestrales à la Drosophile dans la phylogénie des insectes. Cependant certaines fonctions développementales semblent conservées entre toutes les espèces testées. Uniquement la fonction de spécification des segments antéro-postérieurs semble perdue chez *D. melanogaster* qui présente toujours tous ses segments spécifiés en absence de *svb* ou *pri*.

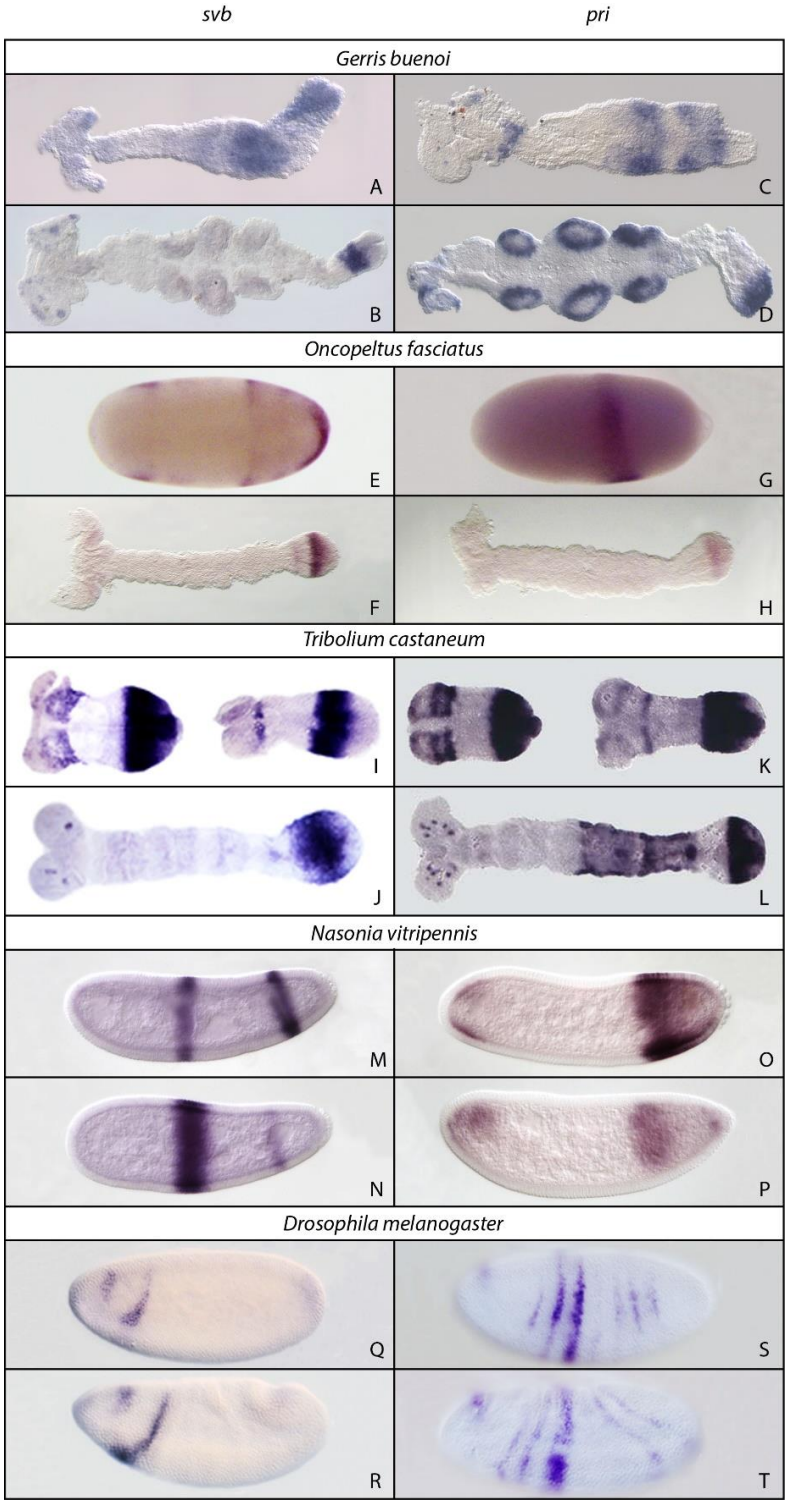


Figure 31 : Récapitulatif de l'expression de *svb, pri* et *Ubr3* chez les cinq espèces étudiées

Expression d*e svb* et *pri* pour *G. buenoi* (A à D), *O. fasciatus* (E à H), *T. castaneum* (I à L), *N. Vitripennis* (M à P) et *D. melanogaster* (Q à T). Deux stades sont présents pour chaque gène et chaque espèce. Le plus jeune stade est représenté sur la photo du haut et le plus tardif sur la photo du bas. Nous avons tenté de présenter des stades relativement similaires afin de pouvoir comparer le patron d'expression de *svb* et *pri* pour les cinq espèces présentes. L'in-situ de *pri* pour *T. castaneum* provient de l'étude de (Savard *et al.,* 2006), les autres In-situs de *T. castaneum* sont issus des résultats de Suparna Ray et Martin Klinger. Les résultats de *N. Vitripennis* et *O. fasciatus* ont été réalisés par Miriam Rosenberg, ceux de *D. melanogaster* ont été réalisés par Hélène Chanut et François Payre.

d. Expression de *pri* et *svb* pour d'autres espèces

L'expression de *pri* et *svb* s'est révélée très similaire pour toutes les espèces testées particulièrement pour *G. buenoi* (Fig.31-B-D), *O. fasciatus* (Fig.31.F-H) et *T. castaneum* (Fig.31-J-L) qui présentent des modes de développement similaires. Plus précisément l'expression de *pri* et *svb* au stade où les segments antéro-postérieurs sont ajoutés est identique et très forte dans la zone de croissance.

L'expression de *pri* et *svb* a également été testée plus tôt dans le développement pour les espèces additionnelles à *G.buenoi*. Cela a permis de montrer que *pri* et *svb* était localisés postérieurement à des stades de développement antérieurs à ceux étudiés chez *G. buenoi*.

Pour *N. Vitripennis* l'expression de *pri* et *svb* (Fig.31-M à P) est assez similaire aux embryons de *G. buenoi, O. fasciatus* et *T. castaneum*. Cependant il ne s'agit pas exactement du même patron d'expression dû au mode de segmentation intermédiaire de *N. vitripennis*. L'expression de *svb* et *pri* reste tout de même comme les autres espèces exprimées de façon postérieure.

Si l'on compare à présent l'expression de *svb* et *pri* entre la Drosophile (Fig.31-Q à T) et les espèces qui nous a permis de montrer des fonctions de segmentation antéro-postérieure on remarque que l'expression est différente. Particulièrement au début du développement, on remarque que *svb* et *pri* sont exprimés dans la partie antérieure des embryons de *D. melanogaster* alors que chez les autres espèces ces deux gènes sont également exprimés dans la zone de croissance de l'embryon. L'expression antérieure chez *D. melanogaster* correspond d'ailleurs à la zone où les pièces buccales se forment et où nous observons des modifications en absence de *pri* et *svb (Chanut-Delalande et al., 2014).* Enfin l'expression de *pri* présente d'autres différences chez *D. melanogaster* avec une expression de *pri* qui n'est pas localisée du côté postérieur de l'embryon mais qui est présente en plusieurs bandes le long de l'axe antéro-postérieur.

Le patron d'expression de *pri* et *svb* présente donc de grandes différences entre *D. melanogaster* et les autres espèces étudiées. Ces différences d'expression sont notamment du côté postérieur de l'embryon pourraient expliquer pourquoi la fonction de segmentation antéro-postérieure est absente chez *D. melanogaster*.

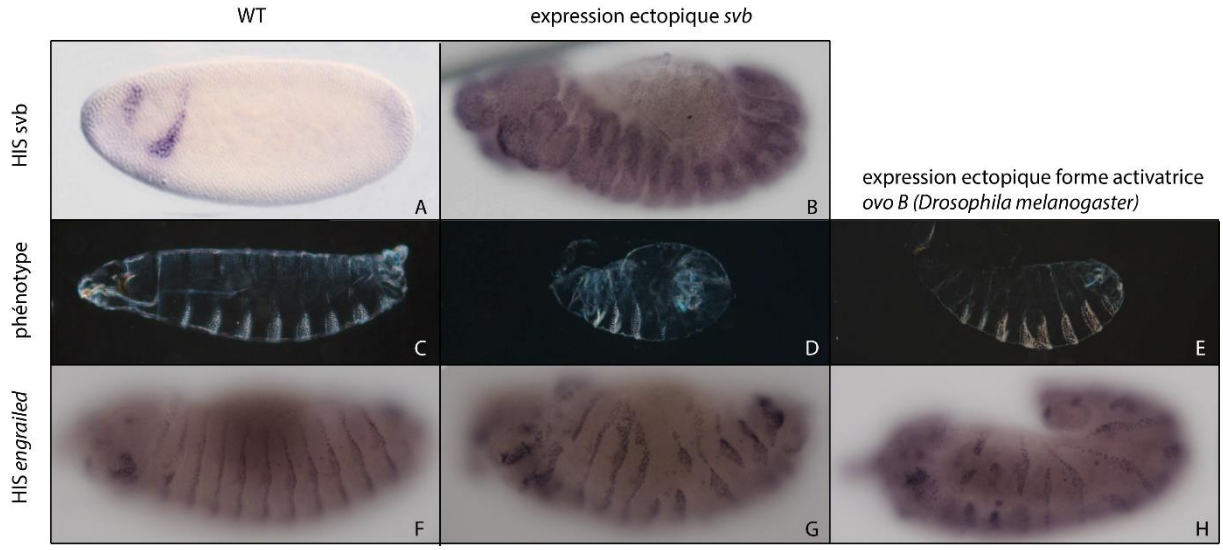


Figure 32 : Réactivation de *svb* dans les embryons de *D. melanogaster*

Phénotype observé lorsque *svb* est exprimé ectopiquement dans les embryons de *D. melanogaster* de façon ubiquitaire (D, E, G et H) comparé à des embryons sauvages (A, C et F). Une HIS de *svb* montre l'expression sauvage de *svb* (A) comparée à l'expression induite ectopiquement (B). Une HIS *d'engrailed (en)* normalement exprimé dans tous les segments (F) permet de mieux visualiser les défauts de segmentation induit par l'expression ectopique de *svb* (G et H).

Ces résultats ont été réalisés par Hélène Chanut et François Payre.

e. Réactivation de l'expression de svb chez *D. melanogaster*

Les différences d'expression de *pri* et *svb* entre *D. melanogaster* et les autres espèces pourraient être à l'origine des différences de fonction énumérées précédemment. De ce fait nous avons décidé d'induire l'expression de *svb* de façon ubiquitaire dans les embryons de *D. melanogaster* (Fig.30). De cette manière la partie postérieure de l'embryon où *svb* n'est pas exprimé chez *D. melanogaster* présentera une expression pour le gène *svb* comme pour les espèces que nous avons testées. Si la présence de *svb* à ce stade dans l'embryon est suffisante pour modifier la segmentation des embryons cela suggèrera que la perte de cette fonction dans la segmentation est probablement liée à la perte d'expression de *svb* du côté postérieur de l'embryon à ce stade.

L'expression ectopique de *svb* tôt dans le développement a largement perturbé le développement des embryons (Fig.30). Les embryons où l'expression de *svb* a été modifiée présentent des défauts antéro-postérieurs important où certains segments sont supprimés et surtout désorganisés (Fig.30-D-G).

De plus si l'on réactive la forme *ovo B* chez la Drosophile qui est la forme *d'ovo/svb* activée par l'intermédiaire de *pri* on provoque également des défauts de segmentation (Fig.30-E-H). Ces défauts, qui sont très sévères, suggèrent que les défauts de segmentation observés sont probablement provoqués à l'aide de *svb* et *pri.* Une autre possibilité est que la partie commune entre la forme activatrice et répressive de *svb* est suffisante pour altérer la segmentation de l'embryon.

3. Discussion

a. Fonction de *pri, svb* et *Ubr3*

L'étude de la fonction des trois gènes impliqués principalement dans la formation des trichomes chez *D. melanogaster* a permis d'observer des fonctions impliquées dans la segmentation antéro-postérieure de l'embryon.
Les phénotypes ARNi se sont révélés particulièrement similaires pour *svb, pri* et *Ubr3* ce qui suggère que ces trois gènes interagissent ensemble comme chez la Drosophile (Zanet *et al.,* 2015).
La fonction dans la formation des trichomes et de la cuticule semble conservée pour *G. buenoi*, cela renforce donc l'hypothèse que *svb, pri* et *Ubr3* interagissent bien ensemble. La fonction de segmentation a donc été perdue chez la Drosophile et semble ancestrale chez les insectes.

Les différences de fonction de *pri, svb* et *Ubr3* observées chez *T. castaneum* comparé à *O. fasciatus* et *G. buenoi* suggèrent qu'en plus de la fonction dans la segmentation de l'embryon, *pri* à des fonctions additionnelles chez *T. castaneum*.
Cette fonction qui semble réprimer l'apparition des pattes chez *T. castaneum* est surement liée à une différence d'expression de ces gènes. Par exemple l'expression du gène *pri* comparé aux autres espèces testées a pu être modifiée. En effet il a été montré que *pri* est exprimé très fortement dans les segments abdominaux, tard pendant l'embryogénèse de *Tribolium* (Savard *et al.,* 2006). Ce domaine d'expression coïncide avec la localisation et le développement des appendices. Cette expression pourrait donc expliquer pourquoi de nouvelles pattes se forment en absence de *pri*.

b. Expression de *pri, svb* et *Ubr3*

La comparaison de l'expression de *pri* et *svb* entre les espèces étudiées et *D. melanogaster* a permis de mettre en évidence une expression dynamique ainsi qu'une expression postérieure tôt dans le développement qui est absente chez *D. melanogaster*. Une réactivation de *svb* dans la totalité de l'embryon et spécifiquement de sa forme activatrice a permis d'observer des défauts de segmentation. Ce qui suggère que c'est bien l'absence de l'expression de *svb* tôt dans le développement du côté postérieur de *D. melanogaster* qui explique l'absence de fonction dans la segmentation antéro-postérieure.

D'autre part l'expression ectopique de la forme *ovo B* (forme activatrice d'ovo chez la Drosophile) a permis d'obtenir des résultats similaires et même plus sévères comparé à l'expérience réalisée avec *svb*. Or cette forme est présente initialement chez la Drosophile par l'intermédiaire de la modification post-transcriptionnelle de *svb / ovo A* (forme répressive de *svb* chez la Drosophile), grâce à *pri* et *Ubr3,* pour la formation des trichomes . Ceci suggère indirectement que la fonction de segmentation réactivée ectopiquement chez la Drosophile et qui a perturbée les segments antéro-postérieurs, est permise par l'intermédiaire de *pri* et *Ubr3* tout comme la fonction des trichomes.

Ces résultats confortent l'hypothèse que la fonction segmentaire de ce module de trois gènes chez les espèces ancestrales à la Drosophile requiert les mêmes mécanismes génétiques que ceux de la Drosophile utilisés pour la formation des trichomes.

Enfin l'expression postérieure de *svb* et *pri* est présente dans la zone de croissance qui constitue le tissu à partir duquel les segments des espèces long germ band sont ajoutés. L'expression et la fonction de *svb, pri* et *Ubr3* pourraient donc directement être associées à l'ajout et à la spécification des segments des espèces au mode de segmentation ancestrale (Liu and Kaufman, 2005b), (Stahi and Chipman, 2016).

D'autre part lorsque nous induisons l'expression ectopique de *svb,* les segments chez *D. melanogaster* sont fortement altérés. L'expression ectopique de *svb* pourrait donc avoir provoqué l'ajout « contradictoire » de segment du côté postérieur de la *D. melanogaster* ce qui aurait perturbée sa segmentation.

Il est donc possible que chez *D. melanogaster* l'absence de fonction segmentaire de *svb* est due au mode de segmentation short germ band où tous les segments sont spécifiés au même moment le long de l'axe antéro-postérieur.

4. Conclusions & perspectives

En résumé, nos expériences révèlent comment trois gènes, initialement découverts chez *D. melanogaster* pour la formation des trichomes (Payre *et al.,* 1999), possèdent une fonction ancestrale commune qui est très importante pour la segmentation embryonnaire chez les insectes. La fonction de ces gènes nous permet de compléter le réseau de gènes impliqué dans la segmentation concernant d'autres espèces que la Drosophile.

L'étude de la fonction de ces gènes met également en lumière les limitations à utiliser l'organisme modèle *D. melanogaster* qui présente un mode de segmentation hautement dérivé comparé aux autres insectes. Ceci suggère qu'il faut accentuer la volonté d'étudier le développement chez d'autres espèces que la Drosophile et procéder à des cribles de gènes non biaisés afin de mieux comprendre les bases génétiques de la segmentation des insectes (Peel *et al.,* 2005), (Schönauer *et al.,* 2016), (Auman and Chipman, 2017).

a. Interaction *pri, svb* et *Ubr3*

Il serait vraiment intéressant de vérifier l'interaction de *pri*, *svb* et *Ubr3*. En effet nos expériences ont permis uniquement de manière indirecte de montrer une interaction potentielle entre ces trois gènes. Pour déterminer si *pri* et *svb* interagissent bien entre-eux et de la même manière que chez la Drosophile, nous devons vérifier si le complexe *pri-Ubr3* est capable d'induire la troncation de la protéine Svb (Zanet *et al.,* 2015).

Pour cela nous pourrions réaliser un western blot comme cela a été réalisé pour la Drosophile, (Zanet *et al.,* 2015). Il s'agit d'une technique de biologie moléculaire permettant de détecter et d'identifier des protéines grâce à des anticorps spécifiques des protéines recherchées. Nous désignerons donc deux anticorps, l'un spécifique de la séquence protéique tronquée de *svb* et l'autre détectant la protéine non tronquée de *svb*. Ainsi nous serons capables de détecter si *pri* coupe *svb* en obtenant deux bandes sur le gel du western.
Dans une seconde étape nous réaliserons la même méthode mais grâce à des échantillons provenant d'embryons $Ubr3^{ARNi}$. Si *pri* coupe *svb* grâce au complexe de *pri* avec *Ubr3*, comme chez la Drosophile, en absence *d'Ubr3, pri* sera donc incapable de tronquer *svb*, nous obtiendrons donc une seule bande.

Confirmer l'interaction de ces trois gènes pourra nous aider à mieux comprendre les causes qui expliquent les différences de fonctions observées entre *D. melanogaster* et les insectes plus ancestraux. De plus montrer des preuves concrètes de la conservation de ce réseau de gènes pourra nous permettre de mieux comprendre l'évolution de ce réseau de gènes entre la Drosophile et les espèces étudiées.

b. Fonction des peptides Pri

Certains de nos résultats montrent que *pri* pourrait être requis pour la fonction de segmentation chez les insectes ancestraux à la Drosophile. L'étude de la fonction de *pri* est donc primordiale pour comprendre l'évolution de la fonction du module *pri, svb* et *Ubr3*.

La séquence du gène *pri* est transcrite en ARNm polycistronique qui contient des ORFs (open reading frame, cadre de lecture ouverte) courtes qui codent pour trois peptides de onze acides aminés et un peptide de trente-deux acides aminés chez la Drosophile 11 ou 32 peptides *(Kondo et al., 2007).* Chez *D. melanogaster* les peptides Pri montrent une fonction redondante qui implique sa fonction dans la formation des denticules (Savard *et al.,* 2006), (Kondo *et al.,* 2007).

Avec notre modèle d'étude nous ne sommes pas capable de réaliser des méthodes de transgénèse afin d'étudier la fonction de chacun de ces peptides néanmoins l'étude de la transcription et de la conservation de ces peptides grâce au transcriptome et au génome des espèces ancestrales à la Drosophile pourrait nous donner des indications sur la manière dont la fonction de *pri* a évolué.

c. Compléter le réseau de gènes *pri, svb* et *Ubr3*

Les marquages de segmentation effectués sur les embryons svb^{ARNi} et/ou pri^{ARNi} tel que *Wg* chez *G. buenoi* ou *giant* et d'autres gènes gap chez *T. castaneum* (Savard *et al.,* 2006), ont révélé une expression altérée de ces gènes, qui sont impliqués dans la segmentation. Les défauts de svb^{ARNi} sont très sévères, ils affectent la formation des segments antéro-postérieurs de l'embryon ce qui pourrait expliquer pourquoi l'expression de ces gènes est diminuée. Cependant il serait intéressant de vérifier si ces gènes interagissent entre eux. On pourra également directement détecter une interaction par gel-retard qui est une technique de biologie moléculaire qui permet de mettre en évidence des interactions entre une protéine et de l'ADN ou ARN.

Dans un second temps l'étude du complexe *pri-Ubr3* et *svb* qui est formé à l'aide des peptides *pri* pourrait nous permettre de mettre en évidence de nouveaux candidats. Il existe des méthodes expérimentales permettant d'analyser les protéines qui constituent un complexe protéique comme par exemple la méthode de co-immunoprécipitation. Cette technique est utilisée en biologie moléculaire pour analyser les interactions protéine-protéine.

Compléter le réseau de gènes de *pri, Ubr3* et *svb* pourrait nous permettre de mieux comprendre comment ces trois gènes affectent la segmentation chez les insectes short germ band. De plus, au sein des quatre espèces étudiées en dehors de la Drosophile, on note certaines différences dans les phénotypes ARNi observés. Ceci pourrait peut-être donc nous permettre de mettre en évidence des gènes cibles ou des régulateurs de *svb, pri* et *Ubr3* qui diffèrent entre les espèces étudiées qui pourraient expliquer les différences de fonction que nous avons observées.

d. Fonction de *pri, svb* et *Ubr3* chez les insectes long germ band

Notre étude comprend trois espèces présentant un mode de segmentation short germ band *(G. buenoi, O. fasciatus,* et *T. castaneum),* une espèce long germ band (*D. melanogaster)* et une espèce présentant un mode de segmentation intermédiaire *(N. vitripennis)* avec des caractéristiques des deux modes de segmentations (Rosenberg *et al.,* 2014). Il est donc difficile de déterminer si la fonction de segmentation antéro-postérieure chez les espèces ancestrales à la Drosophile est associée à son mode de segmentation dérivé.

Il serait donc intéressant de tester la fonction de *pri, svb* et *Ubr3* chez d'autres espèces présentant un mode de segmentation long germ band comme la Drosophile. De cette manière nous pourrons déterminer si la fonction de segmentation est spécifique des espèces présentant un mode de segmentation short germ band. Grâce à cela nous parviendrons peut-être à mieux comprendre quelles sont les bases génétiques qui expliquent la différence entre le mode de segmentation short et long germ band.

V. Bibliographie

Agrawal, N., Dasaradhi, P., Mohmmed, A., Malhotra, P., Bhatnagar, R.K., and Mukherjee, S.K. (2003). RNA interference: biology, mechanism, and applications. Microbiology and molecular biology reviews *67*, 657-685.

Akam, M. (1989). Hox and HOM: homologous gene clusters in insects and vertebrates. Cell *57*, 347-349.

Andersen, N. (1982). The semiaquatic bugs (Hemiptera, Gerromorpha): phylogeny, adaptations, biogeography and classification. 1982 (Scandinavian Science Press).

Andersen, N.M. (1976). A Comparative Study of Locomotion on the Water Surface in Semiaquatic Bugs (Insecta, Hemiptera, Gerromorpha).

Armisén, D., Nagui Refki, P., Crumière, A.J.J., Viala, S., Toubiana, W., and Khila, A. (2015). Predator strike shapes antipredator phenotype through new genetic interactions in water striders. Nature Communications *6*, 8153.

Auman, T., and Chipman, A.D. (2017). The Evolution of Gene Regulatory Networks that Define Arthropod Body Plans. Integrative and comparative biology.

Baker, J., Liu, J.-P., Robertson, E.J., and Efstratiadis, A. (1993). Role of insulin-like growth factors in embryonic and postnatal growth. Cell *75*, 73-82.

Bateson, W., and Mendel, G. (2013). Mendel's principles of heredity (Courier Corporation).

Berleth, T., Burri, M., Thoma, G., Bopp, D., Richstein, S., Frigerio, G., Noll, M., and Nüsslein-Volhard, C. (1988). The role of localization of bicoid RNA in organizing the anterior pattern of the Drosophila embryo. The EMBO journal *7*, 1749.

Carroll, S.B. (2008). Evo-devo and an expanding evolutionary synthesis: a genetic theory of morphological evolution. Cell *134*, 25-36.

Cavodeassi, F., Modolell, J., and Gómez-Skarmeta, J.L. (2001). The Iroquois family of genes: from body building to neural patterning. Development *128*, 2847-2855.

Chanock, S.J., Manolio, T., Boehnke, M., Boerwinkle, E., Hunter, D.J., Thomas, G., Hirschhorn, J.N., Abecasis, G., Altshuler, D., and Bailey-Wilson, J.E. (2007). Replicating genotype–phenotype associations. Nature *447*, 655-660.

Chanut-Delalande, H., Hashimoto, Y., Pelissier-Monier, A., Spokony, R., Dib, A., Kondo, T., Bohère, J., Niimi, K., Latapie, Y., and Inagaki, S. (2014). Pri peptides are mediators of ecdysone for the temporal control of development. Nature cell biology *16*, 1035-1044.

Charlesworth, B. (1991). The evolution of sex chromosomes. Science *251*, 1030-1033.

Cheng, L., Yang, C.M., and Andersen, N.M. (2001). Guide to the aquatic heteroptera of Singapore andpeninsular Malaysia. I. Gerridae and hermatobatidae. The Raffles Bulletin of Zoology *49*, 129-148.

Cobben, R.H. (1968). Evolutionary trends in Heteroptera (sn]).

Cohen, S.N., Chang, A.C., and Hsu, L. (1972). Nonchromosomal antibiotic resistance in bacteria: genetic transformation of Escherichia coli by R-factor DNA. Proceedings of the National Academy of Sciences *69*, 2110-2114.

Córdoba, S., Requena, D., Jory, A., Saiz, A., and Estella, C. (2016). The evolutionarily conserved transcription factor Sp1 controls appendage growth through Notch signaling. Development *143*, 3623-3631.

Crow, J.F. (2000). The origins, patterns and implications of human spontaneous mutation. Nature reviews Genetics *1*, 40.

Crumiere, A.J., Santos, M.E., Sémon, M., Armisén, D., Moreira, F.F., and Khila, A. (2016). Diversity in Morphology and Locomotory Behavior Is Associated with Niche Expansion in the Semi-aquatic Bugs. Current Biology *26*, 3336-3342.

Damgaard, J. (2008). Phylogeny of the semiaquatic bugs (Hemiptera-Heteroptera, Gerromorpha). Insect Systematics & Evolution *39*, 431-460.

Darwin, C. (1859). On the origin of the species by natural selection.

Darwin, C., and Beer, G. (1951). The origin of species (Dent).

Darwin, C., and Bynum, W.F. (2009). The origin of species by means of natural selection: or, the preservation of favored races in the struggle for life (AL Burt).

Davis, G.K., and Patel, N.H. (1999). The origin and evolution of segmentation. Trends in Genetics *15*, M68-M72.

Drake, J.W., Charlesworth, B., Charlesworth, D., and Crow, J.F. (1998). Rates of spontaneous mutation. Genetics *148*, 1667-1686.

Fairbairn, D.J. (1992). The origins of allometry: size and shape polymorphism in the common waterstrider, Gerris remigis Say (Heteroptera, Gerridae). Biological Journal of the Linnean Society *45*, 167-186.

Galindo, M.I., Pueyo, J.I., Fouix, S., Bishop, S.A., and Couso, J.P. (2007). Peptides encoded by short ORFs control development and define a new eukaryotic gene family. PLoS biology *5*, e106.

Gao, X., and Jiang, L. (2004). Biophysics: water-repellent legs of water striders. Nature *432*, 36-36.

Guichet, A., Copeland, J.W., Erdelyi, M., and Hlousek, D. (1997). The nuclear receptor homologue Ftz-F1 and the homeodomain protein Ftz are mutually dependent cofactors. Nature *385*, 548.

Hartl, D.L., Clark, A.G., and Clark, A.G. (1997). Principles of population genetics, Vol 116 (Sinauer associates Sunderland).

Hu, D.L., Chan, B., and Bush, J.W. (2003). The hydrodynamics of water strider locomotion. Nature *424*, 663-666.

Hughes, C.L., and Kaufman, T.C. (2002). Hox genes and the evolution of the arthropod body plan1. Evolution & development *4*, 459-499.

Jaczewski, T. (1930). Notes on the American species of the genus Mesovelia Muls.(Heteroptera, Mesoveliidae. Paper presented at: Annales Musei Zoologici Polonici (nakładem Państwowego Muzeum Zoologicznego).

Kerber, B., Monge, I., Mueller, M., Mitchell, P.J., and Cohen, S.M. (2001). The AP-2 transcription factor is required for joint formation and cell survival in Drosophila leg development. Development *128*, 1231-1238.

Khila, A., Abouheif, E., and Rowe, L. (2009). Evolution of a novel appendage ground plan in water striders is driven by changes in the Hox gene Ultrabithorax. PLoS Genet *5*, e1000583-e1000583.

Kimura, M. (1983). The neutral theory of molecular evolution (Cambridge University Press).

King, M.-C., and Wilson, A.C. (1975). Evolution at two levels in humans and chimpanzees.

Klingenberg, C.P., and Zimmermann, M. (1992). Static, ontogenetic, and evolutionary allometry: a multivariate comparison in nine species of water striders. The American Naturalist *140*, 601-620.

Kole, R., Krainer, A.R., and Altman, S. (2012). RNA therapeutics: beyond RNA interference and antisense oligonucleotides. Nature reviews Drug discovery *11*, 125.

Kondo, T., Hashimoto, Y., Kato, K., Inagaki, S., Hayashi, S., and Kageyama, Y. (2007). Small peptide regulators of actin-based cell morphogenesis encoded by a polycistronic mRNA. Nature cell biology *9*, 660-665.

Krumlauf, R. (1994). Hox genes in vertebrate development. Cell *78*, 191-201.

Lewis, E.B. (1978). A gene complex controlling segmentation in Drosophila. In Genes, Development and Cancer (Springer), pp. 205-217.

Lewis Wolpert, T.J., Peter Lawrence, Elliot Meyerowitz, Elizabeth Robertson, Jim Smith (2007). Principles of Development, third edition.

Liu, P.Z., and Kaufman, T.C. (2005a). even-skipped is not a pair-rule gene but has segmental and gap-like functions in Oncopeltus fasciatus, an intermediate germband insect. Development *132*, 2081-2092.

Liu, P.Z., and Kaufman, T.C. (2005b). Short and long germ segmentation: unanswered questions in the evolution of a developmental mode. Evolution & development *7*, 629-646.

Losos, J.B. (2013). The Princeton guide to evolution (Princeton University Press).

Lynch, M., and Walsh, B. (2007). The origins of genome architecture, Vol 98 (Sinauer Associates Sunderland (MA)).

Mahfooz, N., Turchyn, N., Mihajlovic, M., Hrycaj, S., and Popadic, A. (2007). Ubx regulates differential enlargement and diversification of insect hind legs. PLoS One *2*, e866-e866.

Mane-Padros, D., Cruz, J., Vilaplana, L., Nieva, C., Urena, E., Belles, X., and Martin, D. (2010). The hormonal pathway controlling cell death during metamorphosis in a hemimetabolous insect. Dev Biol *346*, 150-160.

Matsuda, R. (1960). Morphology, evolution and a classification of the Gerridae (Hemiptera-Heteroptera). Morfología, evolución y clasificación de los Gerridae (Hemiptera-Heteroptera). The University of Kansas science bulletin *41*, 25-632.

McGinnis, W., Garber, R.L., Wirz, J., Kuroiwa, A., and Gehring, W.J. (1984). A homologous protein-coding sequence in Drosophila homeotic genes and its conservation in other metazoans. Cell *37*, 403-408.

Mevel-Ninio, M., Terracol, R., and Kafatos, F. (1991). The ovo gene of Drosophila encodes a zinc finger protein required for female germ line development. The EMBO journal *10*, 2259.

Mével-Ninio, M., Terracol, R., Salles, C., Vincent, A., and Payre, F. (1995). ovo, a Drosophila gene required for ovarian development, is specifically expressed in the germline and shares most of its coding sequences with shavenbaby, a gene involved in embryo patterning. Mechanisms of development *49*, 83-95.

Morgan, T.H. (1911). Chromosomes and associative inheritance. Science *34*, 636-638.

Mousseau, T.A., and Roff, D.A. (1987). Natural selection and the heritability of fitness components. Heredity *59*, 181-197.

Nei, M. (1987). Molecular evolutionary genetics (Columbia university press).

Ng, P.C., and Henikoff, S. (2003). SIFT: Predicting amino acid changes that affect protein function. Nucleic acids research *31*, 3812-3814.

Nüsslein-Volhard, C., Kluding, H., and Jürgens, G. (1985). Genes affecting the segmental subdivision of the Drosophila embryo. Paper presented at: Cold Spring Harbor symposia on quantitative biology (Cold Spring Harbor Laboratory Press).

Oliver, B., Pauli, D., and Mahowald, A. (1990). Genetic evidence that the ovo locus is involved in Drosophila germ line sex determination. Genetics *125*, 535-550.

Payre, F., Vincent, A., and Carreno, S. (1999). ovo/svb integrates Wingless and DER pathways to control epidermis differentiation. Nature *400*, 271-275.

Peel, A.D., Chipman, A.D., and Akam, M. (2005). Arthropod segmentation: beyond the Drosophila paradigm. Nature reviews Genetics *6*, 905.

Pueyo, J.I., and Couso, J.P. (2008). The 11-aminoacid long Tarsal-less peptides trigger a cell signal in Drosophila leg development. Developmental biology *324*, 192-201.

Refki, P.N., Armisén, D., Crumière, A.J.J., Viala, S., and Khila, A. (2014). Emergence of tissue sensitivity to Hox protein levels underlies the evolution of an adaptive morphological trait. Developmental biology *392*, 441-453.

Refki, P.N., and Khila, A. (2015). Key patterning genes contribute to leg elongation in water striders. EvoDevo *6*, 1-10.

Remold, S.K., and Lenski, R.E. (2001). Contribution of individual random mutations to genotype-by-environment interactions in Escherichia coli. Proceedings of the National Academy of Sciences *98*, 11388-11393.

Richardson, M.K., Hanken, J., Selwood, L., Wright, G.M., Richards, R.J., Pieau, C., and Raynaud, A. (1998). Haeckel, embryos, and evolution. Science *280*, 983-983.

Rosenberg, M., Lynch, J., and Desplan, C. (2009). Heads and Tails: Evolution of Antero-Posterior Patterning in Insects. Biochimica et biophysica acta *1789*, 333-342.

Rosenberg, M.I., Brent, A.E., Payre, F., and Desplan, C. (2014). Dual mode of embryonic development is highlighted by expression and function of Nasonia pair-rule genes. Elife *3*, e01440.

Savard, J., Marques-Souza, H., Aranda, M., and Tautz, D. (2006). A segmentation gene in tribolium produces a polycistronic mRNA that codes for multiple conserved peptides. Cell *126*, 559-569.

Schaeper, N.D., Prpic, N.-M., and Wimmer, E.A. (2009). A conserved function of the zinc finger transcription factor Sp8/9 in allometric appendage growth in the milkweed bug Oncopeltus fasciatus. Development genes and evolution *219*, 427.

Schöck, F., Purnell, B.A., Wimmer, E.A., and Jäckle, H. (1999). Common and diverged functions of the Drosophila gene pair D-Sp1 and buttonhead. Mechanisms of development *89*, 125-132.

Schönauer, A., Paese, C.L., Hilbrant, M., Leite, D.J., Schwager, E.E., Feitosa, N.M., Eibner, C., Damen, W.G., and McGregor, A.P. (2016). The Wnt and Delta-Notch signalling pathways interact to direct pair-rule gene expression via caudal during segment addition in the spider Parasteatoda tepidariorum. Development *143*, 2455-2463.

Schroder, R. (2003). The genes orthodenticle and hunchback substitute for bicoid in the beetle Tribolium. Nature *422*, 621.

Schulz, C., Schröder, R., Hausdorf, B., Wolff, C., and Tautz, D. (1998). A caudal homologue in the short germ band beetle Tribolium shows similarities to both, the Drosophila and the vertebrate caudal expression patterns. Development genes and evolution *208*, 283-289.

Sniegowski, P.D., Gerrish, P.J., and Lenski, R.E. (1997). Evolution of high mutation rates in experimental populations of E. coli. Nature *387*, 703.

Stahi, R., and Chipman, A.D. (2016). Blastoderm segmentation in Oncopeltus fasciatus and the evolution of insect segmentation mechanisms. Paper presented at: Proc R Soc B (The Royal Society).

Stauber, M., Jäckle, H., and Schmidt-Ott, U. (1999). The anterior determinant bicoid of Drosophila is a derived Hox class 3 gene. Proceedings of the National Academy of Sciences *96*, 3786-3789.

Stauber, M., Taubert, H., and Schmidt-Ott, U. (2000). Function of bicoid and hunchback homologs in the basal cyclorrhaphan fly Megaselia (Phoridae). Proceedings of the National Academy of Sciences *97*, 10844-10849.

Stern, D.L. (2003). The Hox gene Ultrabithorax modulates the shape and size of the third leg of Drosophila by influencing diverse mechanisms. Developmental biology *256*, 355-366.

Suzuki, D.T., and Griffiths, A.J. (1976). An introduction to genetic analysis (WH Freeman and Company.).

Swalla, B. (2006). Building divergent body plans with similar genetic pathways. Heredity *97*, 235.

Tseng, M., and Rowe, L. (1999). Sexual dimorphism and allometry in the giant water strider Gigantometra gigas. Canadian Journal of Zoology *77*, 923-929.

Wagner, G.P. (2007). The developmental genetics of homology. Nature reviews Genetics *8*, 473.

Watson, J.D., and Crick, F.H. (1953). Molecular structure of nucleic acids. Nature *171*, 737-738.

Weissing, F.J., Edelaar, P., and Van Doorn, G.S. (2011). Adaptive speciation theory: a conceptual review. Behavioral ecology and sociobiology *65*, 461-480.

West, L.C., and Cresswell, P. (2013). Expanding roles for GILT in immunity. Current opinion in immunology *25*, 103-108.

Wolff, C., Schroder, R., Schulz, C., Tautz, D., and Klingler, M. (1998). Regulation of the Tribolium homologues of caudal and hunchback in Drosophila: evidence for maternal gradient systems in a short germ embryo. Development *125*, 3645-3654.

Yu, Y., Li, W., Su, K., and Yussa, M. (1997). The nuclear hormone receptor Ftz-F1 is a cofactor for the Drosophila homeodomain protein Ftz. Nature *385*, 552.

Zanet, J., Benrabah, E., Li, T., Pélissier-Monier, A., Chanut-Delalande, H., Ronsin, B., Bellen, H., Payre, F., and Plaza, S. (2015). Pri sORF peptides induce selective proteasome-mediated protein processing. Science *349*, 1356-1358.

Zuckerkandl, E., and Pauling, L. (1965). Evolutionary divergence and convergence in proteins. Evolving genes and proteins *97*, 97-166.

VI. Annexes

Protocole

Annexe 1 : Extraction d'ARN au trizol 93
Annexe 2 : Transcription inverse (RT PCR) 94
Annexe 3 : PCR, exemple d'une amplification de gêne pour le projet Crible 95
Annexe 4 : Ligation (Promega). 96
- Annexe 5 : Carte plasmidique pGEM®-T (Promega) 96

Annexe 6 : Transformation 97
Annexe 7 : Vérification des clones recombinants (possédant l'insert) 97
Annexe 8 : Miniprep 98
Annexe 9 : Préparation des sondes 99
Annexe 10 : Hybridation in-situ 100
Annexe 11 : Préparation de l'ARN double brin (ARNdb) 103
Annexe 12 : Purification d'ARN 104
Annexe 13 : Fonction des gènes à partir de bibliographie 105
Annexe 14 : Arbre phylogénétique ftz-f1 107
Annexe 15 : Arbre phylogénétique d'Iro-like 108
Annexe 16 : Arbre phylogénétique de Sp-like 109
Annexe 17 : Arbre phylogénétique de TfAp-2 110
Annexe 18 : Test statistique normalité pour chaque condition testée 111
Annexe 19 : Test statistique pour la taille du corps 111
Annexe 20 : Test statistique pour la taille relative des pattes 111
Annexe 21 : Tests statistiques des segments de la première paire de patte 112
Annexe 22 : Tests statistiques des segments de la seconde paire de patte 112
Annexe 23 : Tests statistiques des segments de la troisième paire de patte 112
Annexe 24 : Mesures des segments des pattes pour les embryons A. paludum sauvages, ftz-f1ARNi, Iro-likeARNi, et M. mulsanti sauvage 113
Annexe 25 : Photo représentant la mesure du corps pour A. paludum sauvage 124
Annexe 26 : Photo représentant les mesures des segments des pattes pour A. paludum sauvage .. 124

1. Protocoles

Annexe 1 : Extraction d'ARN au trizol

Etapes préliminaire en cas d'extraction sur des embryons :

1) Nettoyer les embryons à l'aide de Javel 50% (pas trop longtemps sinon les embryons explosent).
2) Réaliser un maximum de rinçage avec de l'eau DEPC ou du PTW 0.05% pour éliminer la javel
3) Transférer les embryons dans un tube eppendorf.

Broyage des insectes et/ou embryons :

1) Déposer 100 µL de trizol sur les insectes, broyer à l'aide d'un pilon en plastique stérile, puis centrifuger 1 minute à 4000 rpm puis transférer le surnageant dans un nouveau tube.
2) Déposer de nouveau 100 µL de trizol sur le broyat et broyer de nouveau les insectes, puis centrifuger 1 min à 4000 rpm puis transférer le surnageant avec celui récupéré précédemment.
3) Déposer de nouveau 200 µL de trizol sur le broyat et broyer de nouveau les insectes, puis centrifuger 1 min à 4000 rpm puis transférer le surnageant avec ceux précédemment récupérer.

Extraction :

1) Ajouter 600 µL de trizol aux surnageant issus du broyage puis homogénéiser.
2) Incuber 5 min à température ambiante.
3) Ajouter 200 µL de chloroforme et agiter vigoureusement pendant 15 secondes.
4) Incuber à température ambiante pendant 2-3 min.
5) Centrifuger à 12000 x g pendant 15min à 2-8°C.
6) Transférer la phase aqueuse (celle du dessus) dans un nouveau tube.
7) Ajouter 500 µL d'iso-propyl alcohol.
8) Incuber 10 min à température ambiante.
9) Centrifuger à 12000 x g pendant 10 min à 2-8°C.
10) Eliminer le surnageant et laver le culot avec 1 mL d'ethanol à 75% et vortexer.
11) Centrifuger à 7500 x g pendant 5 min à 2-8°C puis éliminer le surnageant.
12) Laisser sécher le culot pendant 5-10 min.
13) Dissoudre l'ARN avec 100 µL d'ARNase-free (eau DEPC) ou eau millipore et incuber 10 min à 55-60°C.
14) Vérifier l'extraction sur gel d'agarose (1µL).

En cas de conservation longue :

1) Précipiter dans des sels : Acétate de sodium 3M (concentration final 10%) + 600µL ethanol 100% (3 volumes).
2) Conserver à -20°C ou -80°C.

Annexe 2 : Transcription inverse (RT PCR)

Il s'agit d'une réaction en chaîne par polymérase (PCR) à par d'ARN pour synthétiser de l'ADN. D'après le protocole fournis par le Kit « SuperScript III First Synthesis System for RT-PCR » (Invitrogen). Permet convertir 1pg à 5µg de l'ARN total ou 1 µg à 500 ng d'ARN poly(A) en ADN complémentaire (ADNc).

Etapes :

1) Faire un traitement pour éliminer l'ADN avec : une DNAse : (1µL, Promega) et un tampon Dnase (1µL, Promega) pendant 30min à 37°C.
2) Centrifuger et mélanger chaque composant avant utilisation.
3) Dans un tube eppendorf déposer :

ARN (selon la concentration)	8 µL
Primer : 50 µM oligo $(dT)_{20}$ ou 2 µM amorce pour gène spécifique (GSP) ou 50 ng/µL random hexamers	1µL
10 mM dNTP mix	1µL

4) Incuber 5 min à 65°C puis placer dans la glace au moins 1 min.
5) Préparer le mix pour la synthèse de l'ADNc :

	1 Réaction	10 Réactions
Tampon 10X	2 µL	20 µL
25mM MgCl2	4µL	40µL
0.1 M DTT	2µL	20µL
RNaseOut (40 U/µL)	1µL	10µL
SuperScript III RT (200 U/µL)	1µL	10µL

6) Ajouter 10 µl du mix d'ADNc synthétisé à chaque mélange ARN / amorce, mélanger délicatement, et les récupérer par une brève centrifugation.
7) Incuber ensuite le mélange comme ceci :
   Oligo $(dT)_{20}$ ou GSP primed: 50 min à 50°C.
   Random hexamer primed: 10 min à 25°C, suivie par 50 min at 50°C.
8) Terminer les réactions à 85 ° C pendant 5 min. Refroidir sur glace.
9) Recueillir les réactions par une brève centrifugation. Ajouter 1 µl de RNase H dans chaque tube et incuber les tubes pendant 20 minutes à 37 ° C.
10) Conserver à -20°C ou amplifier immédiatement par PCR.

Annexe 3 : PCR, exemple d'une amplification de gêne pour le projet Crible

Matrice : ADNc de l'espèce pour laquelle on veut amplifier le gène d'intérêt.

Amorce :
Essai: les amorces sont spécifiques du gène à amplifier précédemment désignées à l'aide de Geneious et commandées sur Eurogentec.
Contrôle négatif: même amorces que pour l'Essai mais pas de matrice (pas ADNc).

Taille des fragments à amplifiés :
Essai : entre 500 et 950 paires de bases (pb).
Contrôle positif : environ 800 pb (gène *Ubx*).

Enzyme : Taq DNA Polymerase (invitrogene, extension : 1min/kb).

Etapes :

1) Mélanger les réactifs suivants

	Réactifs	Volume (pour 1 réaction)	Volume (pour 10 réactions)
Mix	**Tampon (10X)**	5 µL	50 µL
	dNTPs (10 mM)	2 µL	20 µL
	Primer forward (sens) (10µM)	2 µL	X
	Primer reverse (anti-sens) (10µM)	2 µL	X
	Enzyme Taq (3 à 5 U)	0,5 µL	0.5 µL
	MgCP2 (50 mM)	3 µL	30 µL
	H_2O	qsp 49 µL = 34.5µL	qsp 450 µL = 349.5 µL
Tubes	**ADN**	**1 µL**	**1 µL**
	Primer Forward	X	2 µL
	Primer Reverse	X	**2. µL**

2) Incuber selon les conditions suivantes :

- Dénaturation initiale : 95°C pendant 3 min

- 35 à 40 cycles :
- Dénaturation : 95°C pendant 30sec
- Hybridation : 55°C pendant 30-45sec (dépend de la taille du fragment à amplifier)
- Elongation : 72°C pendant 1 min

- Elongation finale : 72°C pendant 5 à 10 min

- Conserver à 4°C

Les annexes 4 à 8 correspondent aux différentes étapes du clonage d'un gène

Annexe 4 : Ligation (Promega).

1) Calcul quantité d'insert à déposer :

Pour calculer la quantité de vecteur nécessaire par rapport à la quantité d'insert il faut consulter la fiche d'information relative au vecteur utilisé. En général pour une ligation optimale on utilise un ratio de 1 vecteur pour 3 insert ou 1 vecteur pour 1 insert cependant dans le cas du pGEMT on peut déposer jusqu'à 8 fois plus d'insert par rapport au plasmide ou inversement.

Pour un produit PCR de 0,5 kb avec 50 ng de vecteur de 3,0 kb et un ratio de 3: 1 on utilise donc 25ng d'insert :

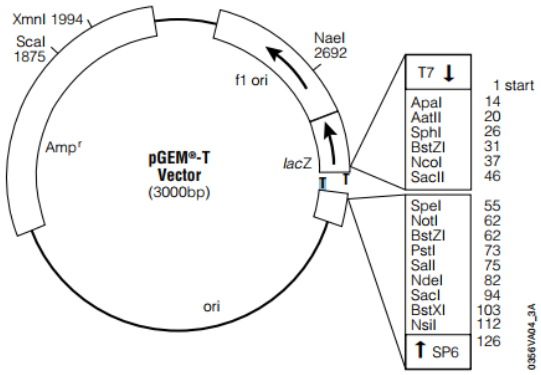
$$\frac{50\text{ng vector} \times 0.5\text{kb insert}}{3.0\text{kb vector}} \times \frac{3}{1} = 25\text{ ng inserts}$$

2) Etapes de la ligation :

- Dans un tube eppendorf déposer les constituants suivants puis incuber 2h à température ambiante ou toute la nuit à 4°C.

Tampon ligation 10X	1µL
Plasmide pGEM-T (50ng/µL)	1µL
Enzyme Ligase T4	1µL
ADN (selon la concentration)	1 à 7µL
Eau millipore	qsp 10

• Annexe 5 : Carte plasmidique pGEM®-T (Promega)



Remarque: Les insertions peuvent être séquencées à l'aide de l'amorce du promoteur SP6 (Cat. # Q5011) et de l'amorce du promoteur T7 (N ° de cat. Q5021).

Points de référence du vecteur pGEM®-T:

- Site d'initiation de la transcription de l'ARN polymérase T7 → 1
- Région de clonage multiple → 10-113
- Promoteur de l'ARN polymérase SP6 → (-17 à +3) 124-143
- Site d'initiation de la transcription de l'ARN polymerase SP6 → 126
- Site de liaison du primer anti-sens PUC et M13 → 161-177
- Codon de démarrage LacZ → 165
- Opérateur lac → 185-201
- Région codante ß-lactamase → 1322-2182
- Région Phage f1 → 2365-2820
- Séquences d'opéron lac → 2821-2981 et 151-380
- Site de liaison du primer sens PUC et M13 → 2941-2957
- Promoteur de l'ARN polymérase T7 → (-17 à +3) 2984-3

Annexe 6 : Transformation

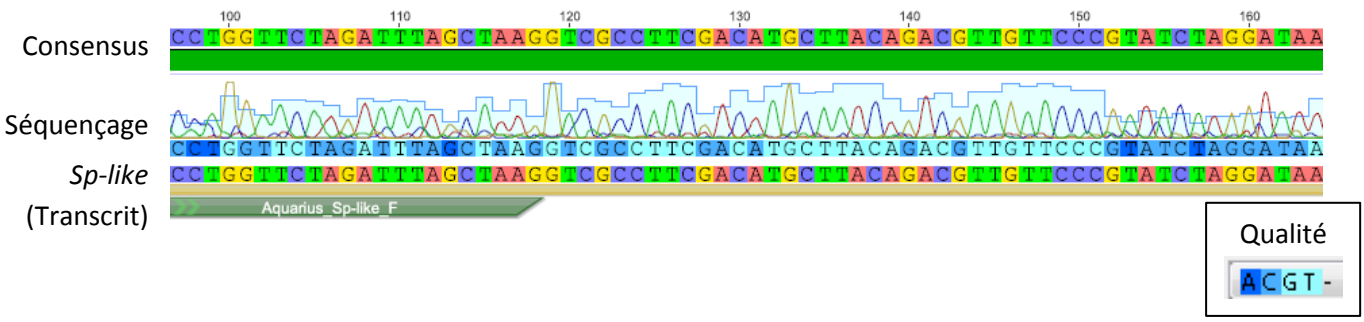
Etapes :

1) Ajouter au 10µL de ligation préalablement préparée, au 50µL de bactérie DH5α compétentes (ne pas agiter !). Pour vérifier l'efficacité des bactéries compétentes: ajouter 2,5µL de pUC19 dans 50 µL de bactérie DH5α compétente.
2) Incuber les cellules dans la glace pendant 30 min.
3) Réaliser un choc thermique en plaçant les bactéries mélanger à la ligation 25 sec exactes à 42°C et transférer très rapidement le tube dans la glace pendant 2 min (ne pas agiter !).
4) Ajouter 500µL de LB médium sur le mélange et incuber à 37°C pendant 45min-60min.
5) Pendant ce temps préparer les boites de milieu LB et ampicilline en ajoutant (10 µL IPTG (0.1M)) et 40µL de X-gal (20mg/mL), laissé les sécher.
6) Après les 45-60min étaler le contenu du tube sur les boites précédemment préparées à l'aide d'un râteau stérile.
   Sur une boite déposer 50µL et sur l'autre 450 µL pour chaque transformation.
7) Pour les contrôles (transformation et ligation) étaler 100µL.
8) Incuber toute la nuit à 37°C.
9) Conserver à 4°C

Annexe 7 : Vérification des clones recombinants (possédant l'insert)

Etapes :

1) Après 24h le développement de la couleur bleue sur les colonies apparait, il est possible de placer les boites à 4°C afin d'amplifier le développement de la couleur bleue.
   Les colonies blanches contiennent généralement l'insert qui se place au niveau du site de clonage lacz d'où l'absence de couleur bleu qui provient uniquement de la dégradation du X-gal des boites par les bactéries possédant l'enzyme lacZ (les non recombinantes).
2) Afin de vérifier l'insertion du plasmide et d'établir le sens d'insertion de celui-ci on peut réaliser une PCR à l'aide des séquences M13-F et M-13R présentent sur le plasmide et qui flanquent l'insert.
3) Pour vérifier que l'insert correspond bien au gène d'intérêt initialement amplifié par PCR on envoie le produit de la PCR (ou du plasmide issu d'un miniprep voir annexe suivante) à séquencer à la compagnie Genewiz.
4) Enfin une fois le résultat du séquençage obtenu un alignement de la séquence provenant du séquençage sera réalisé à partir de la séquence initiale du gène d'intérêt, ainsi qu'un blast sur NCBI pour vérifier que cette séquence correspond bien au gène d'intérêt (Exemple ci-dessous).



Annexe 8 : Miniprep

D'après le protocole fourni par le Kit Qiaprep Spin Miniprep Kit (Qiagen). Ce protocole est conçu pour la purification d'ADN plasmidique d'un maximum de 20 pg.

Au préalable réaliser une culture sur la nuit à partir d'une colonie recombinante issue de la transformation dans 1 à 5 mL dans LB. Ajouter si nécessaire 50-100µg/mL d'ampicilline.
Remarque: toutes les étapes du protocole doivent être effectuées à température ambiante.

Etapes :

1) Réaliser un stock de la culture précédentes à partir: 700µL culture + 300µL glycérol et déposer à -80°C.
2) Centrifuger 3 min à 8000 rpm puis éliminer le surnageant. Centrifuger plus longtemps si le milieu reste trouble.
3) Re-suspendre le culot dans 250 µl de tampon P1 (conserver à 4°C). Assurez-vous que la RNase A a été ajouté au tampon P1. Aucun amas de cellules ne doit être visible après remise en suspension du culot.
4) Ajouter 250 µl de tampon P2 et retourner doucement le tube 4-6 fois pour le mélanger. Ne pas vortexer l'ADN génomique sera détruit. Si nécessaire, continuer d'inverser le tube jusqu'à ce que la solution devienne légèrement claire. Ne pas dépasser 5min.
5) Ajouter 350 µl de tampon N3 et inverser le tube immédiatement mais doucement 4-6 fois. Pour éviter la précipitation localisée, mélanger la solution doucement mais complètement, et immédiatement après addition de tampon N3. La solution doit devenir trouble.
6) Centrifuger pendant 10 min à 13 000 rpm (~ 17 900 x g) dans une microcentrifugeuse de table. Une pastille blanche compacte se forme.
7) Transférer le surnageant de l'étape 5 à la colonne Spin QIAprep puis centrifuger pendant 30-60 s. Jeter l'écoulement.
8) (Facultatif): Laver la colonne Spin QIAprep en ajoutant 0,5 ml de tampon PB et centrifuger pendant 30-60 s. Jeter l'écoulement.
9) Laver la colonne QIAprep Spin en ajoutant 0.75 mL de tampon PE et centrifuger pendant 30-60 s
10) Centrifugé pendant 1 min. Jeter l'écoulement.
11) Placer la colonne sur un nouveau tube de 1.5mL et éluer l'ADN avec 50 µL de tampon EB ou de l'eau millipore placé au centre de la colonne. Laisser 1 à 5 min reposer puis centrifuger pendant 1 min à 13 000 rpm.
12) Conserver la miniprep à -20°C, elle peut être diluée à 10-100ng/µL pour réaliser des PCR pour la préparation des sondes et double brin d'ARN (ARNdb).

Annexe 9 : Préparation des sondes

Etapes :

1) Préparer le mix suivant :

Réactifs	Quantité
Tampon transcription 10X	2µL
DIG-RNA labeling mix	2µL
ADN	500ng
RNase Out	1µL
ARN polymérase (T7 ou SP6 en fonction de l'orientation)	2µL
H_2O	qsp 20µL

2) Incuber 2 à 4h à 37°C.
3) Ajouter 1µL de DNase (RNase free) et incuber 10min à 37°C.
4) Vérifier 1µL sur gel d'agarose.
5) Purifier l'ARN avec le kit Qiagen RNeasy.
6) Eluer dans 50 µL d'eau DEPC ou de la RNase free water.
7) Vérifier 1µL sur gel d'agarose.
8) Ajouter 50µL de solution d'hybridation à la sonde bien agiter en aspirant et rejetant la solution et conserver à -80°C.

Annexe 10 : Hybridation in-situ

Préparation des embryons

1) Récolter les embryons aux stades désirés puis les nettoyer à l'aide de javel en concentration décroissante (50% puis 25%).
2) Rincer au moins trois fois les embryons à l'aide de 0.05 % Tween, puis retirer le chorion à l'aide de pinces fines tout en conservant les embryons dans la glace jusqu'à la fixation.
3) Fixer les embryons pendant 20 minutes (! ne pas dépasser 30 min) dans une solution de Para formaldéhyde (200µL) additionné à l'aide de DMSO (20µL) et d'heptane (600µL).
4) Retirer la solution fixative (celle du fond) puis ajouter 0.5mL de méthanol froid (20°C) puis agiter délicatement.
5) Retirer la totalité de la solution puis rincer avec 1mL de méthanol froid.
6) Réaliser 3 rinçages successifs au méthanol pendant 5 minutes avec agitation.
7) Les embryons peuvent être conservés à -20°C jusqu'à utilisation.

Etapes de l'in-situs :

Jour 1 :

1) Réhydrater les embryons à l'aide de concentrations croissantes de solution PTW (0.05 % Tween) diluée dans du méthanol (25%, 50%, 75% et 100% PTW)
2) Laver les embryons 3 fois pendant 5 minutes à l'aide de PTW (0.05 % Tween).
3) Laver les embryons 3 fois pendant 10 minutes à l'aide de PBT (0.3 % Triton).
4) Laver les embryons 2 fois pendant 20 minutes à l'aide de PBT (1 % Triton).
5) Laver les embryons avec 1 volume de PBT + 1volume Hybe-B (250µL + 250µL) pendant 5 minutes.
6) Replacer ensuite les embryons dans 500µL d'Hybe-B pré-incuber à température ambiante puis incuber pendant 1h à 60°C.
7) Pendant ce temps préparer les sondes (2µL de sonde dans 10µL d'Hybe-B) puis réaliser un choc thermique de 2 minutes à 95°C. Placer ensuite les sondes 1 minute dans la glace puis pré-incuber les à 60°C.
8) Retirer ensuite toute la solution d'Hybe-B des embryons pour la remplacer par la sonde.
9) Incuber les embryons toute la nuit à 60°C.

Jour 2 :

1) Pré-incuber la solution d'Hybe-B à 60°C puis rincer les embryons trois fois dans du Hybe pendant 5 minutes.
2) Incuber les embryons 30 min à 60°C dans l'Hybe-B pré-incubé à 60°C.
3) Pendant ce temps préparer 3 solutions de PBT (0.3 % Triton) dilué dans de l'Hybe-B avec une solution avec une concentration de 1 volume pour 3 volumes (1v/3v), la seconde (1v/1v), et la dernière (3v/1v). Placer ces trois solutions ainsi que du PBT (0.3 % Triton) à 60°C.
4) Remplacer l'Hybe B qui recouvre les embryons par 500µL de PBT (0.3 % Triton)/ Hybe-B (1v/3v) et incuber les 10 minutes à 60°C.
5) Remplacer la solution précédente par 500µL de PBT (0.3 % Triton)/ Hybe-B (1v/1v) et incubé les embryons 10 minutes à 60°C.
6) Remplacer la solution précédente par 500µL de PBT (0.3 % Triton)/ Hybe-B (3v/1v) et incubé les embryons 10 minutes à 60°C.

7) Remplacer la solution précédente par 500 µL de PBT (0.3 % Triton) et incubé les embryons les 10 minutes à température ambiante.
8) Laver les embryons 3 fois pendant 10 minutes à l'aide de PBT (0.3 % Triton) et avec agitation.
9) Laver les embryons 4 fois pendant 10 minutes à l'aide de PAT (solution de blocage) et avec agitation.
10) Incuber les embryons pendant 2 heures dans une solution de 1mL d'Anticorps (anticorps à 1 :2000 dans du PAT) et avec agitation.
11) Laver les embryons 3 fois pendant 10 minutes à l'aide de PBT (0.3 % Triton) et avec agitation.
12) Laver les embryons 2 fois pendant 30 minutes à l'aide de PTW (0.05 % Tween) et avec agitation.
13) Laver les embryons à l'aide de tampon AP pendant 5 minutes et avec agitation.
14) Révéler les embryons à l'aide de 1mL de tampon AP auquel on a préalablement ajouté 4.5µL de NBT et 3.5 µL de BCIP.
15) Lorsque les embryons montrent un marquage stable et lorsque le bruit de fond commence à peine à se distinguer stopper la réaction à l'aide de 1mL de PBT (0.3 % Triton).
16) Laver les embryons 5 fois pendant 5 minutes à l'aide PBT (0.3 % Triton) et avec agitation.
17) Laver les embryons 2 fois pendant 10 minutes à l'aide de PTW (0.1 % Tween) et avec agitation.
18) Laver les embryons pendant 5 minutes à l'aide de Glycérol dilué dans du PTW (0.1 % Tween) (30%) et avec agitation.
19) Laver les embryons pendant 5 minutes à l'aide de Glycérol dilué dans du PTW (0.1 % Tween) (50%) et avec agitation.
20) Monter les embryons entre lame et lamelle à l'aide de Glycérol (80%) puis stocker les lames à 4°C.

Solutions :

- 10X PBS : mélanger 80 g NaCl, 2 g KCl, 2 g KH_2PO_4, 11,5 g Na_2HPO_4 compléter à 1L avec de l'eau millipore, puis ajuster le pH à 7.4 avec une solution de NaOH, enfin autoclavé la solution.
- PTW : 1X PBS, 0,05 % Tween-20
- PAT : 1X PBS, 1 % Triton, 1 % BSA

- Hybe-B : Mélanger les constituants suivants puis bien homogénéiser.

Concentration finale	Volume
Formamide 50 %	50 ml
Salts 1 X	10 ml
Dextran Sulfate 5 %	10 ml
Yeast ARNt	1 ml
H_2O	29 ml

- 1X Salt : Mélanger les constituants suivants puis ajuster le pH à 6.8 et le volume 100 ml. Enfin autoclaver la solution et ajouter 0.2g de BSA.

Réactifs	Quantité
NaCl	17.5 g
Tris-base	1.21 g
NaH_2PO_4 (H_2O)	0.71 g
Na_2HPO_4	0.71 g
Ficoll 400	0.2 g
PVP	0.2 g
EDTA 0.5 M	10 ml

- AP buffer :

Réactifs	Quantité
Tris pH 9.5 (1 M)	1 mL
MgCP2 (1 M)	500 µL
NaCl (5 M)	200 µL
Tween 20 (20 %)	50 µL
H_2O (qsp 10mL)	8.25 mL

- L'Anti-Digoxigenin-AP est commandée (Roche, Catalog Nr. 11093274910).

- La solution NBT (4-nitro blue tetrazolium chloride (Applichem)) est préparée à 75 mg/ml dans 70 % de dimethylformamide et d'eau (conservée à -20°C)

- La solution BCIP: (Brom-4-chlor-3-indolylphosphat - p-Toluidinsalt (Applichem)) est préparée à 50mg/mL dans 100 % de dimethylformamide (conservée à -20°C)

Annexe 11 : Préparation de l'ARN double brin (ARNdb)

Etapes :

1) Préparer le mix suivant :

Réactifs	Quantité
10 X Transcription Buffer	10µL
RNase Out	1µL
10mM dNTPs	10µL
ADN	Environ 1µg
(fragment PCR amplifié avec les amorces T7)	10µL
ARN polymérase T7	2µL
H_2O (qsp 100µL)	67µL

2) Incuber toute la nuit à 37°C.
3) Ajouter 2µL de DNase et incuber 10 min à 37°C.
4) Ajouter 2 µL de solution stop et incuber 10 min à 65°C.
5) Vérifier l'ARN double brin sur gel d'agarose.
6) Purifier l'ARN double brin avec le kit Qiagen RNeasy kit.
7) Eluer avec de l'eau millipore : ajouter 50 µL puis attendre 5 min et centrifuger, ajouter de nouveau 50µL puis attendre 5 min et centrifuger.
8) Réaliser le speed Vac (environ 30 à 60min) et ajouter le tampon d'injection de façon à avoir une concentration 1X.

Annexe 12 : Purification d'ARN

Nécessaire pour la purification des sondes in-situ et de l'ARNdb. D'après le protocole fourni par le Kit : RNeasy Mini Kit (Qiagen).

Etapes :

1) Ajouter 4 volumes d'éthanol 100% dans le tampon RPE.
2) Ajuster le volume de la solution à purifier avec 100 µL d'eau RNase-free.
3) Ajouter 350µL du tampon RLT et bien mélanger.
4) Ajouter 250µL d'éthanol 100% mixé par aspirement refoulement.
5) Transférer l'échantillon (700µL) dans la colonne RNeasy, la placer dans un tube de collection de 2 mL.
6) Centrifuger 15 secs à 8000 g, jeter l'écoulement.
7) Ajouter 500µL de tampon RPE à la colonne RNeasy.
8) Centrifuger 15 secs à 8000 g, jeter l'écoulement.
9) Ajouter 500µL de tampon RPE à la colonne RNeasy.
10) Centrifuger 15 secs à 8000 g, jeter l'écoulement.
11) Placer la colonne sur un nouveau tube de collection.
12) Centrifuger 2 min à 8000g.
13) Placer la colonne sur un nouveau tube de collection de 1.5mL.
14) Eluer l'ARN avec 30-50µL d'eau RNase-free.
15) Laisser incuber la colonne 5 min à température ambiante.
16) Centrifuger 1min à 8000g pour éluer l'ARN.
17) Conserver à -20°C ou -80°C.

2. Résultats

Annexe 13 : Fonction des gènes à partir de bibliographie

Gêne	Morphogénèse appendice	Segmentation Pattes/embryons	Croissance membres/tissues	Régulation gène homéotique	Poils
bric a brac	x				
brahma	x			x	
brinker	x		x		
combgap	x				
cramped		x		x	
female sterile (1) homeotic	x			x	
ftz transcription factor 1	x	x		x	
hairy		x			x
Iroquois-family-Like	x				x
kismet	x	x			
Kruppel	x	x			
moira	x				
Nucleosome remodeling factor				x	
osa	x	x		x	
ovo/shavenbaby	x				
polybromo	x				
rpd3		x			
Sp-family-like			x		
tiptop	x	x			
Transcription factor AP-2	x	x			
protein with btb domain	?				
protein with ZF domain	?				
unknown	?				

La plupart des fonctions ont été déterminées à partir de publications référencées sur flybase, nous nous somme focalisés sur les fonctions qui peuvent affecter la taille des pattes, qui pouvait réguler les gènes Hox (*Ubx*) pour modifier la taille des pattes, et les gènes pouvant affecter la densité des poils en fonction annexe.

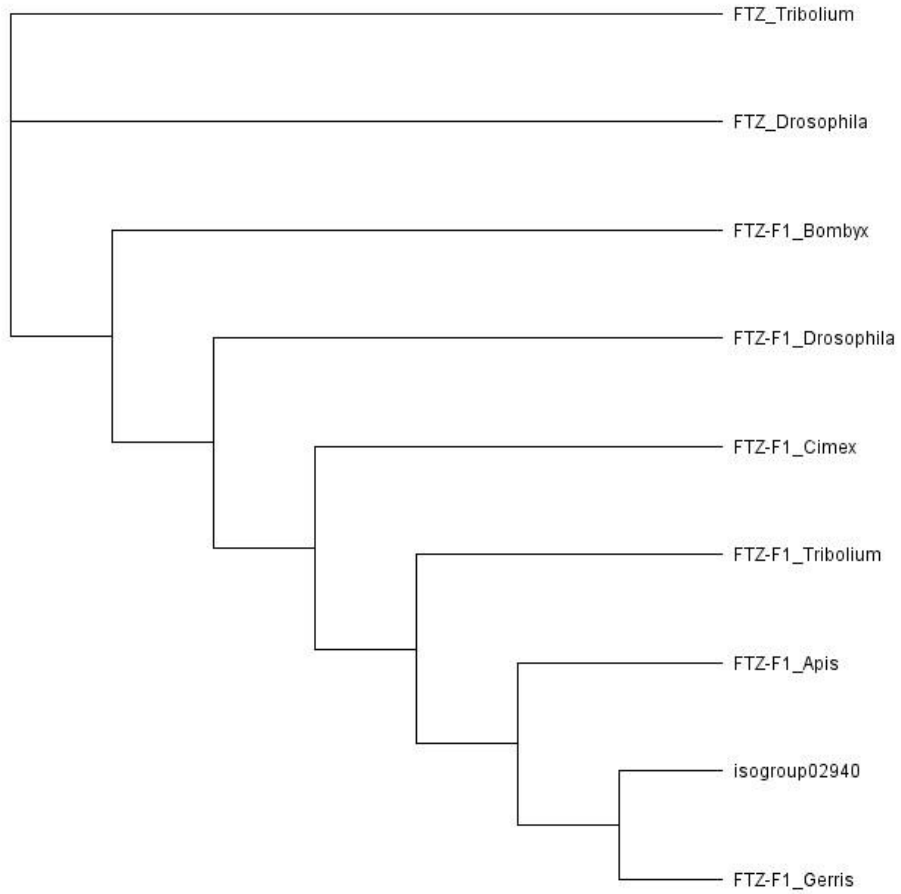
Annexes 14 à 17: Phylogénies des gènes *ftz-f1, Iro-like, Sp-like* et *TfAP-2*

Les phylogénies sont basées sur l'alignement des séquences provenant du blast x du gène d'intérêt réalisé contre la base de données NR de NCBI et qui présentent les meilleurs scores de blast. De plus nous nous sommes focalisés sur les gènes provenant de transcriptomes et génome fiables pour lesquelles l'annotation semble correcte comme ceux de *Tribolium castaneum, Drosophila melanogaster, Apis mellifera, Bombyx mori* et *Cimex lectularius*. Nous avons également ajouté la séquence du gène recherché provenant du génome *Gerris buenoi* (Gerridae) basé sur une annotation automatique et manuelle pour certaines familles de gènes.

La méthode de reconstruction phylogénétique utilisée est le neighbour joining sans outgroup (arbre non enraciné). Ces arbres phylogénétiques permettent la visualisation des groupes de gènes pour vérifier l'identité de chacun des gènes étudiés, cela est nécessaire si le résultat du blast fournit différents noms de gène. Cela est très fréquent lorsque l'on recherche un gène provenant d'une famille constituée de gènes possédant des domaines protéiques très proches.

Ces arbres ont été tracés à l'aide du logiciel Geneious et la distance des branches n'est pas présentée car nous souhaitons seulement vérifier à qu'elle groupe de gènes s'apparente notre gène d'intérêt.

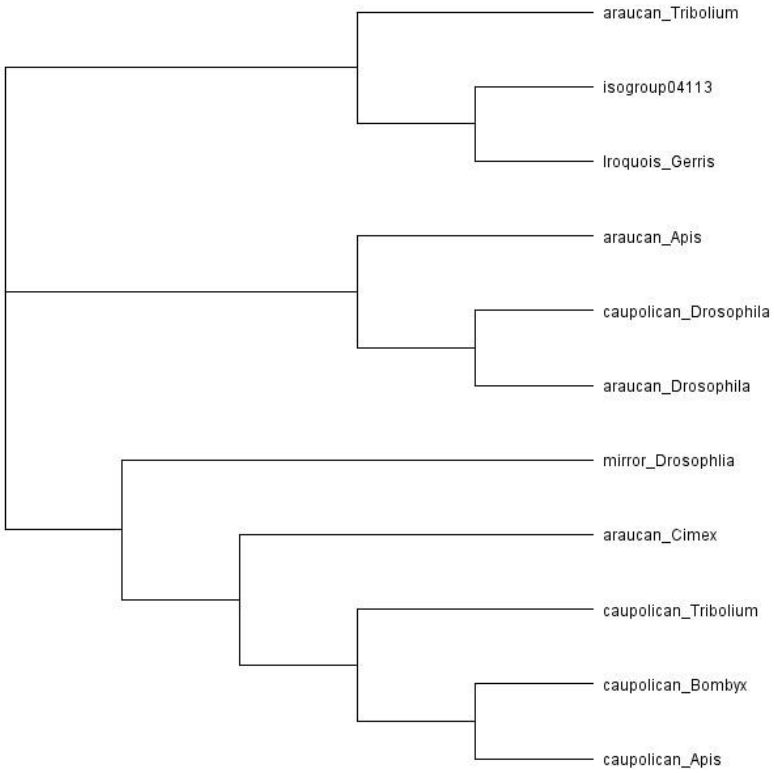
Annexe 14 : Arbre phylogénétique ftz-f1



Gène	Espèce	Numéro accession
FTZ-F1_Tribolium	Tribolium castaneum	XP_008191373.1
FTZ-F1_Gerris	Gerris buenoi	predicted from genome i5k_AD6406B631ED4899A4ED66C46ACF96C0
FTZ-F1_Drosophila	Drosophila melanogaster	NP_524143.2
FTZ-F1_Cimex	Cimex lectularius	XP_014252286.1
FTZ-F1_Bombyx	Bombyx mori	NP_001037528.2
FTZ-F1_Apis	Apis mellifera	XP_006557455.1
FTZ_Tribolium	Tribolium castaneum	AAC46491.1
FTZ_Drosophila	Drosophila melanogaster	NP_477498.1

Les résultats du blast de l'isogroup02940 nous a permis d'obtenir deux noms de gène *fushi tarazu* (FTZ) et *ftz-f1*, le cofacteur de FTZ. Afin de distinguer à qu'elle gène correspond l'isogroup02940 nous avons réalisé un arbre phylogénétique. Sur celui-ci nous pouvons dinstinguer deux groupes FTZ et ftz-f1, et l'isogroup02940 s'associe au second groupe qui contient le gène ftz-f1. Il semblerait donc que l'isogroup02940 correspond au gène ftz-f1.

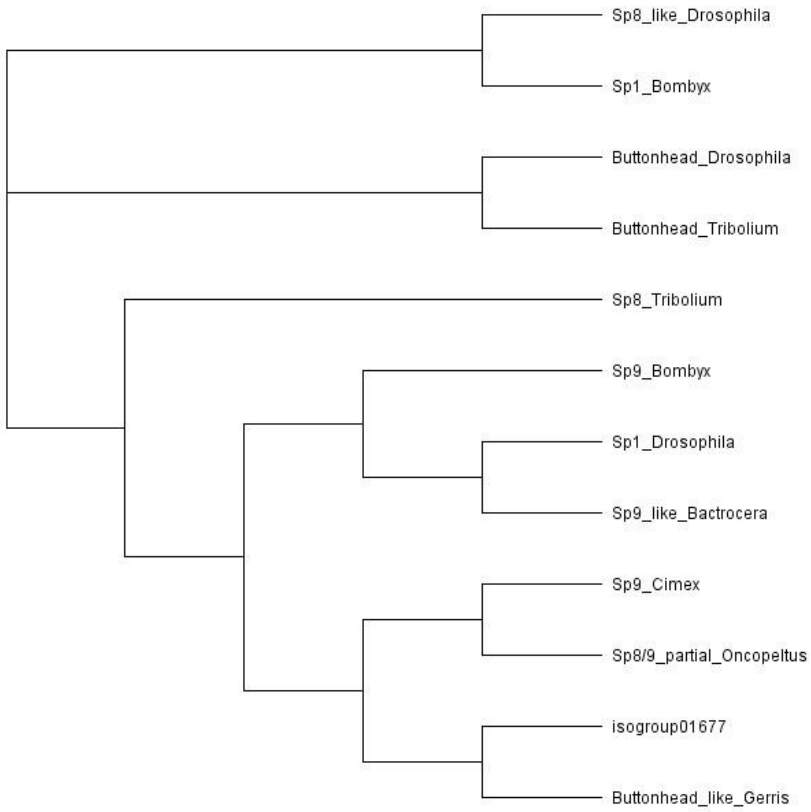
Annexe 15 : Arbre phylogénétique d'Iro-like



Gène	Espèce	Numéro accession
mirror_Drosophila	*Drosophila melanogaster*	NP_001261778.1
Iroquois_Gerris	*Gerris buenoi*	predicted from genome i5k_9566630D6CBD60C3F948F8AB6208570F
caupolican_Tribolium	*Tribolium castaneum*	XP_971676.1
caupolican_Drosophila	*Drosophila melanogaster*	NP_524046.2
caupolican_Bombyx	*Bombyx mori*	XP_012548899.1
caupolican_Apis	*Apis mellifera*	XP_016770700.1
araucan_Tribolium	*Tribolium castaneum*	XP_008192400.1
araucan_Drosophila	*Drosophila melanogaster*	NP_524045.2
araucan_Cimex	*Cimex lectularius*	XP_014252369.1
araucan_Apis	*Apis mellifera*	XP_012350614.1

Les résultats du blast de l'isogroup04113 nous a permis d'obtenir trois gènes *araucan*, *caupolican* et *mirror* qui appartiennent tous à la famille Iroquois. Afin de distinguer à qu'elle gène correspond l'isogroup04113 nous avons réalisé un arbre phylogénétique. Sur celui-ci nous pouvons dinstinguer trois groupes distincts, néanmoins les gènes de la famille Iroquois ne semblent pas se retrouver dans des groupes séparés. Nous avons répété cet arbre phylogénénique avec plus de séquences (données non montrées) mais non n'avons pas obtenu de résultats concluants. Néanmoins en regardant l'annotation des gènes de la famille Iroquois nous nous sommes rendus compte que la plupart de ses gènes proviennent d'annotation automatique il est donc peu probable que chacune de ces annotations soit correcte d'autant plus de ses gènes présentes des séquences très proches. En conclusion cet arbre phylogénétique n'est pas du tout concluant cependant il semblerait que l'isogroup04113 appartient à la famille Iroquois c'est pourquoi nous l'appelerons « Iro-like ».

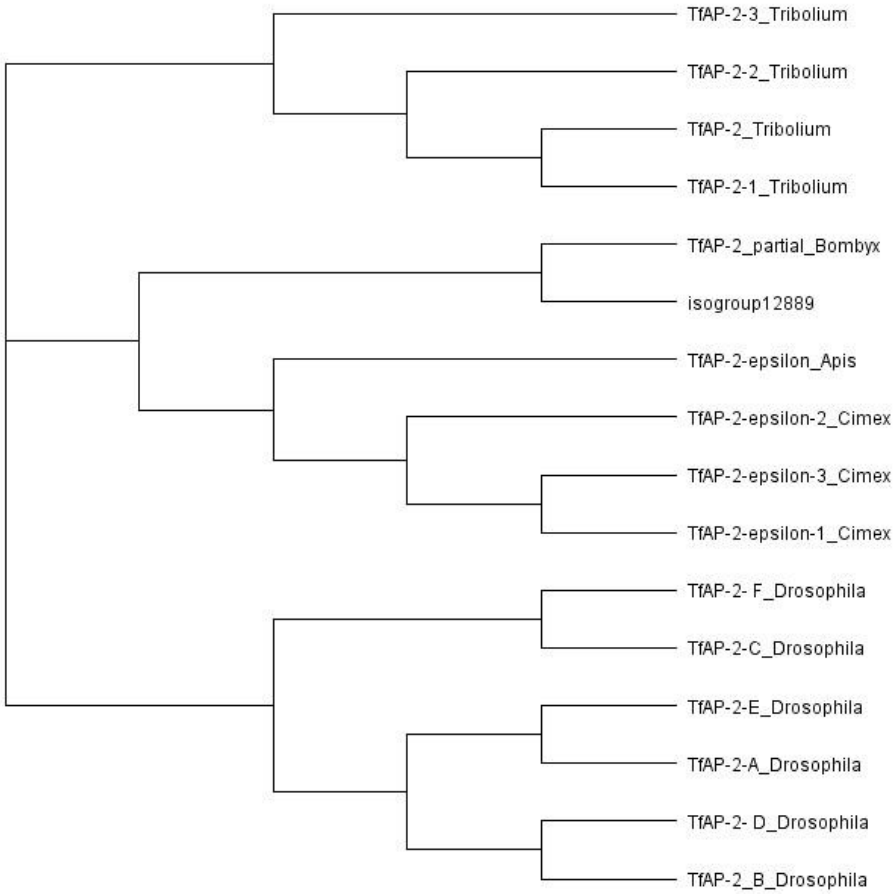
Annexe 16 : Arbre phylogénétique de Sp-like



Gène	Espèce	Numéro accession
Sp9_like_Bactrocera	*Bactrocera dorsalis*	JAC54025.1
Sp9_Cimex	*Cimex lectularius*	XP_014254383.1
Sp9_Bombyx	*Bombyx mori*	XP_004923222.1
Sp8/9_partial_Oncopeltus	*Oncopeltus fasciatus*	CAZ39568.1
Sp8_Tribolium	*Tribolium castaneum*	EFA10688.1
Sp8_like_Drosophila	*Drosophila melanogaster*	NP_651544.1
Sp1_Drosophila	*Drosophila melanogaster*	NP_001259388.1
Sp1_Bombyx	*Bombyx mori*	CAA31417.1
Buttonhead_Tribolium	*Tribolium castaneum*	EFA10687.1
Buttonhead_like_Gerris	*Gerris buenoi*	predicted from genome i5k_C067E726E741814D4BB717A4F0984B5B
Buttonhead_Drosophila	*Drosophila melanogaster*	NP_511100.1

Les résultats du blast de l'isogroup01677 nous a permis d'obtenir trois noms de gène *Sp1*, *Sp9* et *Buttonhead*. *Sp1* et *buttonhead* font partis d'une même famille de protéines à doigt de zinc appelée Sp1/KLF . Afin de distinguer à quel gène correspond l'isogroup01677 nous avons réalisé un arbre phylogénétique. Sur celui-ci nous pouvons dinstinguer plusieurs groupes distincts, néanmoins les gènes de la famille ne semblent pas se retrouver dans des groupes séparés comme pour Iroquois. Cet arbre phylogénétique n'est pas du tout concluant cependant il semblerait que l'isogroup04677 ne correspond pas à Sp1 mais plutôt au gène Sp8/9 de Oncopeltus qui montre d'ailleur une expression et une fonction très similaires (ref), nous appelerons donc cet isogroup « Sp-like ».

Annexe 17 : Arbre phylogénétique de TfAp-2



Gène	Espèce	Numéro accession
TfAP-2- F_Drosophila	*Drosophila melanogaster*	NP_001262180.1
TfAP-2-epsilon_Apis	*Apis mellifera*	XP_016766293.1
TfAP-2-epsilon-3_Cimex	*Cimex lectularius*	XP_014260222.1
TfAP-2-epsilon-2_Cimex	*Cimex lectularius*	XP_014260221.1
TfAP-2-epsilon-1_Cimex	*Cimex lectularius*	XP_014260220.1
TfAP-2-E_Drosophila	*Drosophila melanogaster*	NP_001262179.1
TfAP-2- D_Drosophila	*Drosophila melanogaster*	NP_001262178.1
TfAP-2-C_Drosophila	*Drosophila melanogaster*	NP_001262177.1
TfAP-2-A_Drosophila	*Drosophila melanogaster*	NP_730664.1
TfAP-2_Tribolium	*Tribolium castaneum*	NP_001164083.1
TfAP-2_partial_Bombyx	*Bombyx mori*	BAH83642.1
TfAP-2_B_Drosophila	*Drosophila melanogaster*	NP_649336.1
TfAP-2-3_Tribolium	*Tribolium castaneum*	XP_015837054.1
TfAP-2-2_Tribolium	*Tribolium castaneum*	XP_008195712.1
TfAP-2-1_Tribolium	*Tribolium castaneum*	XP_008195711.1

Les résultats du blast de l'isogroup12889 nous a permis d'obtenir un seul nom de gène TfAP-2. L'arbre phylogénétique nous permet d'appuyer le blast. L'isopgroup12889 correspond donc à TfAP-2.

Les annexes 18 à 23 sont constituées des tableaux comprenant les résultats des tests statistiques pour les mesures des tailles de pattes des conditions ARNi pour les gènes *Iro-like* et *ftz-f1* comparées à des embryons sauvages (WT).
Le code pour les p.value est : 0 '***' 0.001 '**' 0.01 '*' 0.05 '.' 0.1 ' ' 1

Annexe 18 : Test statistique normalité pour chaque condition testée

	P1		P2		P3		Corps	
Shapiro	w	p-value	w	p-value	w	p-value	w	p-value
WT_Aquarius	0.88936	0.1668	0.94745	0.6384	0.97131	0.9027	0.85662	0.06961
Iro-like	0.91685	0.4048	0.97351	0.9214	0.947	0.6331	0.8994	0.1817
ftz-f1	0.9236	0.3498	0.96296	0.808	0.97967	0.9643	0.98322	0.9814
WT_Meso	0.94246	0.5807	0.9541	0.7171	0.94553	0.616	0.94723	0.6359

Vérification de la normalité des données a été testée à l'aide d'un test Shapiro.
L'hypothèse 0, vérifie la normalité si la p.value est supérieur à 0.05. Dans chaque condition la p.value est supérieur à 0.05 on ne rejette donc pas l'hypothèse : les données tendent donc à être normales. On a donc réalisé des analyses statistiques paramétriques.

Annexe 19 : Test statistique pour la taille du corps

Corps	***WT_Aquarius***	***Iro-like***	***ftz-f1***
Iro-like	1.7e-06	_	_
ftz-f1	2.0e-07	0,42	_
WT_Meso	< 2e-16	< 2e-16	< 2e-16

Vérification de la taille du corps entre différentes conditions avec une Anova.
L'hypothèse 0, vérifie que deux valeurs sont différentes si la p.value est inférieur à 0.05. Dans chaque condition la p.value est inférieur à 0.05 excepté entre les corps d'embryons *ftz-f1* et *Iro-like*, on ne rejette donc pas l'hypothèse : les tailles de corps sont donc différentes sauf entre les embryons *Iro-like* et *ftz-f1*.
On a donc utilisé la taille du corps comme cofacteur dans le test d'analyse statistique pour les tailles des pattes et des segments pour vérifier que la différence de taille n'est pas juste causée par des corps plus petits.

Annexe 20 : Test statistique pour la taille relative des pattes

	P1		P2		P3	
	WT_Aquarius		***WT_Aquarius***		***WT_Aquarius***	
anova	F value	Pr (>F)	F value	Pr (>F)	F value	Pr (>F)
Iro-like	10.767	0.005462 **	23.4413	0.0001804 ***	23.4413	0.0001804 ***
ftz-f1	0.4989	0.4895	42.0572	5.60e-06 ***	42.0572	5.60e-06 ***
WT_Meso	13.0118	0.002363 **	28.738	6.37e-05 ***	28.738	6.37e-05 ***

Vérification de la taille relative des pattes entre différentes conditions avec une Anova et en cofacteur la taille du corps. L'hypothèse 0, vérifie que deux valeurs sont différentes si la p.value est inférieur à 0.05. Seule la première paire de patte de ftz-f1 n'est pas différente des embryons sauvages ce qui suggère qu'elle n'est pas modifiée par l'ARNi.

Annexe 21 : Tests statistiques des segments de la première paire de patte

Patte 1	Fémur		Tibia		Tarse	
	WT_Aquarius		***WT_Aquarius***		***WT_Aquarius***	
anova	F value	Pr (>F)	F value	Pr (>F)	F value	Pr (>F)
Iro-like	4.6988	0.047912 *	5.2409	0.0381148 *	18.8038	0.0006838 ***
ftz-f1	0.0990	0.7569	0.0000	0.9981	4.1421	0.05773
WT_Meso	2.7375	0.1174984	8.7053	0.009401 **	3.6678	0.07352

Annexe 22 : Tests statistiques des segments de la seconde paire de patte

Patte 2	Fémur		Tibia		Tarse	
	WT_Aquarius		***WT_Aquarius***		***WT_Aquarius***	
anova	F value	Pr (>F)	F value	Pr (>F)	F value	Pr (>F)
Iro-like	5.3824	0.03389 *	7.4384	0.01491 *	26.722	9.316e-05 ***
ftz-f1	2.4408	0.1366360	14.6521	0.0013470 **	18.421	0.0004935 ***
WT_Meso	0.1452	0.7081	7.0925	0.01701 *	25.3520	0.0001219 ***

Annexe 23 : Tests statistiques des segments de la troisième paire de patte

Patte 3	Fémur		Tibia		Tarse	
	WT_Aquarius		***WT_Aquarius***		***WT_Aquarius***	
anova	F value	Pr (>F)	F value	Pr (>F)	F value	Pr (>F)
Iro-like	30.8336	4.371e-05 ***	3.0125	0.101841	10.743	0.004737 **
ftz-f1	18.572	0.0004751 ***	1.4085	0.25163	9.6934	0.0063201 **
WT_Meso	1.0702	0.316282	4.2170	0.05674	7.2038	0.0163 *

Vérification de la taille des segments pour chaque patte entre différentes conditions avec une Anova et en cofacteur la taille du corps :

L'hypothèse 0, vérifie que deux valeurs sont différentes si la p.value est inférieur à 0.05.

Ici par exemple pour la patte le Tibia dans chaque condition présente une taille similaire alors que le Tarse présente toujours des tailles différentes tout comme le Fémur sauf entre le fémur *d'Aquarius paludum* et de *Mesovelia mulsanti.*

Annexe 24 : Mesures des segments des pattes pour les embryons A. paludum sauvages, ftz-f1ARNi, Iro-likeARNi, et M. mulsanti sauvage

Tableau des mesures brutes des segments des pattes dans chacune des conditions testées : *ftz-f1*^{ARNi}, *Iro-like*^{ARNi} pour *Aquarius paludum* ; ainsi que deux contrôles : *Aquarius paludum* sauvage (Aq_WT) et *Mesovelia mulsanti* sauvages (Meso_WT). A la suite du tableau deux photos représentent un exemple de photo pour les mesures du corps et des segments pour *Aquarius paludum* sauvage.

Condition	Individu	Cote	Patte	Segment	Taille des segments (µm)	Taille du corps (µm)
WT_Aquarius	1a	1	P1	fémur	354,978	1446,337
WT_Aquarius	1a	1	P1	tibia	342,638	1446,337
WT_Aquarius	1a	1	P1	tarse	224,3495	1446,337
WT_Aquarius	1a	1	P1	total	921,9655	1446,337
WT_Aquarius	1a	1	P2	fémur	617,419	1446,337
WT_Aquarius	1a	1	P2	tibia	891,265	1446,337
WT_Aquarius	1a	1	P2	tarse	986,5205	1446,337
WT_Aquarius	1a	1	P2	total	2495,2045	1446,337
WT_Aquarius	1a	1	P3	fémur	659,409	1446,337
WT_Aquarius	1a	1	P3	tibia	467,5695	1446,337
WT_Aquarius	1a	1	P3	tarse	455,4465	1446,337
WT_Aquarius	1a	1	P3	total	1582,425	1446,337
WT_Aquarius	2a	1	P1	fémur	331,957	1493,015
WT_Aquarius	2a	1	P1	tibia	357,091	1493,015
WT_Aquarius	2a	1	P1	tarse	217,673	1493,015
WT_Aquarius	2a	1	P1	total	906,721	1493,015
WT_Aquarius	2a	1	P2	fémur	705,4715	1493,015
WT_Aquarius	2a	1	P2	tibia	910,6095	1493,015
WT_Aquarius	2a	1	P2	tarse	959,2435	1493,015
WT_Aquarius	2a	1	P2	total	2575,3245	1493,015
WT_Aquarius	2a	1	P3	fémur	629,6435	1493,015
WT_Aquarius	2a	1	P3	tibia	453,9345	1493,015
WT_Aquarius	2a	1	P3	tarse	468,1585	1493,015
WT_Aquarius	2a	1	P3	total	1551,7365	1493,015
WT_Aquarius	4a	1	P1	fémur	350,888	1490,206
WT_Aquarius	4a	1	P1	tibia	350,7245	1490,206
WT_Aquarius	4a	1	P1	tarse	221,9145	1490,206
WT_Aquarius	4a	1	P1	total	923,527	1490,206
WT_Aquarius	4a	1	P2	fémur	645,696	1490,206
WT_Aquarius	4a	1	P2	tibia	808,344	1490,206
WT_Aquarius	4a	1	P2	tarse	952,8595	1490,206
WT_Aquarius	4a	1	P2	total	2406,8995	1490,206
WT_Aquarius	4a	1	P3	fémur	625,5245	1490,206
WT_Aquarius	4a	1	P3	tibia	433,376	1490,206
WT_Aquarius	4a	1	P3	tarse	477,374	1490,206
WT_Aquarius	4a	1	P3	total	1536,2745	1490,206

WT_Aquarius	5a	1	P1	fémur	385,486	1484,368
WT_Aquarius	5a	1	P1	tibia	360,5945	1484,368
WT_Aquarius	5a	1	P1	tarse	217,2345	1484,368
WT_Aquarius	5a	1	P1	total	963,315	1484,368
WT_Aquarius	5a	1	P2	fémur	626,235	1484,368
WT_Aquarius	5a	1	P2	tibia	984,332	1484,368
WT_Aquarius	5a	1	P2	tarse	885,9205	1484,368
WT_Aquarius	5a	1	P2	total	2496,4875	1484,368
WT_Aquarius	5a	1	P3	fémur	644,147	1484,368
WT_Aquarius	5a	1	P3	tibia	467,542	1484,368
WT_Aquarius	5a	1	P3	tarse	491,793	1484,368
WT_Aquarius	5a	1	P3	total	1603,482	1484,368
WT_Aquarius	6a	1	P1	fémur	341,7045	1500,907
WT_Aquarius	6a	1	P1	tibia	320,801	1500,907
WT_Aquarius	6a	1	P1	tarse	227,402	1500,907
WT_Aquarius	6a	1	P1	total	889,9075	1500,907
WT_Aquarius	6a	1	P2	fémur	631,0965	1500,907
WT_Aquarius	6a	1	P2	tibia	963,764	1500,907
WT_Aquarius	6a	1	P2	tarse	1014,674	1500,907
WT_Aquarius	6a	1	P2	total	2609,5345	1500,907
WT_Aquarius	6a	1	P3	fémur	586,3815	1500,907
WT_Aquarius	6a	1	P3	tibia	441,405	1500,907
WT_Aquarius	6a	1	P3	tarse	488,1455	1500,907
WT_Aquarius	6a	1	P3	total	1515,932	1500,907
WT_Aquarius	7a	1	P1	fémur	376,4935	1481,534
WT_Aquarius	7a	1	P1	tibia	333,5915	1481,534
WT_Aquarius	7a	1	P1	tarse	229,628	1481,534
WT_Aquarius	7a	1	P1	total	939,713	1481,534
WT_Aquarius	7a	1	P2	fémur	628,2015	1481,534
WT_Aquarius	7a	1	P2	tibia	965,594	1481,534
WT_Aquarius	7a	1	P2	tarse	1054,3255	1481,534
WT_Aquarius	7a	1	P2	total	2648,121	1481,534
WT_Aquarius	7a	1	P3	fémur	670,8575	1481,534
WT_Aquarius	7a	1	P3	tibia	522,783	1481,534
WT_Aquarius	7a	1	P3	tarse	503,5215	1481,534
WT_Aquarius	7a	1	P3	total	1697,162	1481,534
WT_Aquarius	8a	1	P1	fémur	332,767	1543,473
WT_Aquarius	8a	1	P1	tibia	341,964	1543,473
WT_Aquarius	8a	1	P1	tarse	226,854	1543,473
WT_Aquarius	8a	1	P1	total	901,585	1543,473
WT_Aquarius	8a	1	P2	fémur	647,278	1543,473
WT_Aquarius	8a	1	P2	tibia	870,778	1543,473
WT_Aquarius	8a	1	P2	tarse	920,8195	1543,473
WT_Aquarius	8a	1	P2	total	2438,8755	1543,473
WT_Aquarius	8a	1	P3	fémur	594,4195	1543,473
WT_Aquarius	8a	1	P3	tibia	399,428	1543,473

WT_Aquarius	8a	1	P3	tarse	481,649	1543,473
WT_Aquarius	8a	1	P3	total	1475,4965	1543,473
WT_Aquarius	9a	1	P1	fémur	385,993	1477,686
WT_Aquarius	9a	1	P1	tibia	370,704	1477,686
WT_Aquarius	9a	1	P1	tarse	235,323	1477,686
WT_Aquarius	9a	1	P1	total	992,02	1477,686
WT_Aquarius	9a	1	P2	fémur	646,1585	1477,686
WT_Aquarius	9a	1	P2	tibia	942,1235	1477,686
WT_Aquarius	9a	1	P2	tarse	994,5015	1477,686
WT_Aquarius	9a	1	P2	total	2582,7835	1477,686
WT_Aquarius	9a	1	P3	fémur	639,4785	1477,686
WT_Aquarius	9a	1	P3	tibia	483,1395	1477,686
WT_Aquarius	9a	1	P3	tarse	479,544	1477,686
WT_Aquarius	9a	1	P3	total	1602,162	1477,686
WT_Aquarius	10a	1	P1	fémur	386,517	1481,023
WT_Aquarius	10a	1	P1	tibia	375,3365	1481,023
WT_Aquarius	10a	1	P1	tarse	229,267	1481,023
WT_Aquarius	10a	1	P1	total	991,1205	1481,023
WT_Aquarius	10a	1	P2	fémur	522,2205	1481,023
WT_Aquarius	10a	1	P2	tibia	1118,776	1481,023
WT_Aquarius	10a	1	P2	tarse	1009,681	1481,023
WT_Aquarius	10a	1	P2	total	2650,6775	1481,023
WT_Aquarius	10a	1	P3	fémur	668,3315	1481,023
WT_Aquarius	10a	1	P3	tibia	525,173	1481,023
WT_Aquarius	10a	1	P3	tarse	460,572	1481,023
WT_Aquarius	10a	1	P3	total	1654,0765	1481,023
WT_Aquarius	11a	1	P1	fémur	338,898	1481,023
WT_Aquarius	11a	1	P1	tibia	324,9395	1481,023
WT_Aquarius	11a	1	P1	tarse	228,292	1481,023
WT_Aquarius	11a	1	P1	total	892,1295	1481,023
WT_Aquarius	11a	1	P2	fémur	634,989	1481,023
WT_Aquarius	11a	1	P2	tibia	935,6835	1481,023
WT_Aquarius	11a	1	P2	tarse	960,9865	1481,023
WT_Aquarius	11a	1	P2	total	2531,659	1481,023
WT_Aquarius	11a	1	P3	fémur	627,0065	1481,023
WT_Aquarius	11a	1	P3	tibia	396,7035	1481,023
WT_Aquarius	11a	1	P3	tarse	506,739	1481,023
WT_Aquarius	11a	1	P3	total	1530,449	1481,023
WT_Meso	1m	1	P1	fémur	332,681	878,944
WT_Meso	1m	1	P1	tibia	204,245	878,944
WT_Meso	1m	1	P1	tarse	124,725	878,944
WT_Meso	1m	1	P1	total	661,651	878,944
WT_Meso	1m	1	P2	fémur	364,0435	878,944
WT_Meso	1m	1	P2	tibia	218,2635	878,944
WT_Meso	1m	1	P2	tarse	152,834	878,944
WT_Meso	1m	1	P2	total	735,141	878,944

WT_Meso	1m	1	P3	fémur	592,627	878,944
WT_Meso	1m	1	P3	tibia	435,691	878,944
WT_Meso	1m	1	P3	tarse	208,003	878,944
WT_Meso	1m	1	P3	total	1236,321	878,944
WT_Meso	2m	1	P1	fémur	295,2895	913,022
WT_Meso	2m	1	P1	tibia	151,827	913,022
WT_Meso	2m	1	P1	tarse	143,2125	913,022
WT_Meso	2m	1	P1	total	590,329	913,022
WT_Meso	2m	1	P2	fémur	325,689	913,022
WT_Meso	2m	1	P2	tibia	194,6475	913,022
WT_Meso	2m	1	P2	tarse	164,2015	913,022
WT_Meso	2m	1	P2	total	684,538	913,022
WT_Meso	2m	1	P3	fémur	530,2525	913,022
WT_Meso	2m	1	P3	tibia	417,427	913,022
WT_Meso	2m	1	P3	tarse	199,5295	913,022
WT_Meso	2m	1	P3	total	1147,209	913,022
WT_Meso	3m	1	P1	fémur	308,509	891,487
WT_Meso	3m	1	P1	tibia	168,692	891,487
WT_Meso	3m	1	P1	tarse	122,501	891,487
WT_Meso	3m	1	P1	total	599,702	891,487
WT_Meso	3m	1	P2	fémur	351,1335	891,487
WT_Meso	3m	1	P2	tibia	217,314	891,487
WT_Meso	3m	1	P2	tarse	141,7325	891,487
WT_Meso	3m	1	P2	total	710,18	891,487
WT_Meso	3m	1	P3	fémur	563,576	891,487
WT_Meso	3m	1	P3	tibia	412,5765	891,487
WT_Meso	3m	1	P3	tarse	158,787	891,487
WT_Meso	3m	1	P3	total	1134,9395	891,487
WT_Meso	4m	1	P1	fémur	296,3605	874,069
WT_Meso	4m	1	P1	tibia	171,0645	874,069
WT_Meso	4m	1	P1	tarse	125,5465	874,069
WT_Meso	4m	1	P1	total	592,9715	874,069
WT_Meso	4m	1	P2	fémur	344,227	874,069
WT_Meso	4m	1	P2	tibia	201,438	874,069
WT_Meso	4m	1	P2	tarse	169,8275	874,069
WT_Meso	4m	1	P2	total	715,4925	874,069
WT_Meso	4m	1	P3	fémur	563,1115	874,069
WT_Meso	4m	1	P3	tibia	430,855	874,069
WT_Meso	4m	1	P3	tarse	213,0585	874,069
WT_Meso	4m	1	P3	total	1207,025	874,069
WT_Meso	5m	1	P1	fémur	273,855	861,92
WT_Meso	5m	1	P1	tibia	212,841	861,92
WT_Meso	5m	1	P1	tarse	143,669	861,92
WT_Meso	5m	1	P1	total	617,673	861,92
WT_Meso	5m	1	P2	fémur	362,523	861,92
WT_Meso	5m	1	P2	tibia	249,373	861,92

WT_Meso	5m	1	P2	tarse	157,1565	861,92
WT_Meso	5m	1	P2	total	769,0525	861,92
WT_Meso	5m	1	P3	fémur	568,553	861,92
WT_Meso	5m	1	P3	tibia	440,588	861,92
WT_Meso	5m	1	P3	tarse	206,429	861,92
WT_Meso	5m	1	P3	total	1215,57	861,92
WT_Meso	6m	1	P1	fémur	337,809	893,664
WT_Meso	6m	1	P1	tibia	188,4375	893,664
WT_Meso	6m	1	P1	tarse	122,988	893,664
WT_Meso	6m	1	P1	total	649,2345	893,664
WT_Meso	6m	1	P2	fémur	404,682	893,664
WT_Meso	6m	1	P2	tibia	259,949	893,664
WT_Meso	6m	1	P2	tarse	147,8675	893,664
WT_Meso	6m	1	P2	total	812,4985	893,664
WT_Meso	6m	1	P3	fémur	618,424	893,664
WT_Meso	6m	1	P3	tibia	505,5005	893,664
WT_Meso	6m	1	P3	tarse	211,301	893,664
WT_Meso	6m	1	P3	total	1335,2255	893,664
WT_Meso	7m	1	P1	fémur	316,318	905,015
WT_Meso	7m	1	P1	tibia	173,4025	905,015
WT_Meso	7m	1	P1	tarse	139,3895	905,015
WT_Meso	7m	1	P1	total	623,994	905,015
WT_Meso	7m	1	P2	fémur	351,0715	905,015
WT_Meso	7m	1	P2	tibia	215,6975	905,015
WT_Meso	7m	1	P2	tarse	160,584	905,015
WT_Meso	7m	1	P2	total	727,353	905,015
WT_Meso	7m	1	P3	fémur	619,0465	905,015
WT_Meso	7m	1	P3	tibia	438,415	905,015
WT_Meso	7m	1	P3	tarse	217,7685	905,015
WT_Meso	7m	1	P3	total	1275,23	905,015
WT_Meso	8m	1	P1	fémur	255,6195	914,518
WT_Meso	8m	1	P1	tibia	176,0765	914,518
WT_Meso	8m	1	P1	tarse	131,879	914,518
WT_Meso	8m	1	P1	total	563,575	914,518
WT_Meso	8m	1	P2	fémur	367,4935	914,518
WT_Meso	8m	1	P2	tibia	208,445	914,518
WT_Meso	8m	1	P2	tarse	156,7755	914,518
WT_Meso	8m	1	P2	total	732,714	914,518
WT_Meso	8m	1	P3	fémur	640,9475	914,518
WT_Meso	8m	1	P3	tibia	424,147	914,518
WT_Meso	8m	1	P3	tarse	168,4815	914,518
WT_Meso	8m	1	P3	total	1233,576	914,518
WT_Meso	9m	1	P1	fémur	275,6095	924,941
WT_Meso	9m	1	P1	tibia	166,7865	924,941
WT_Meso	9m	1	P1	tarse	130,2775	924,941
WT_Meso	9m	1	P1	total	572,6735	924,941

WT_Meso	9m	1	P2	fémur	373,731	924,941
WT_Meso	9m	1	P2	tibia	226,511	924,941
WT_Meso	9m	1	P2	tarse	151,585	924,941
WT_Meso	9m	1	P2	total	751,827	924,941
WT_Meso	9m	1	P3	fémur	608,505	924,941
WT_Meso	9m	1	P3	tibia	392,1295	924,941
WT_Meso	9m	1	P3	tarse	198,726	924,941
WT_Meso	9m	1	P3	total	1199,3605	924,941
WT_Meso	10m	1	P1	fémur	313,0455	920,605
WT_Meso	10m	1	P1	tibia	195,817	920,605
WT_Meso	10m	1	P1	tarse	69,275	920,605
WT_Meso	10m	1	P1	total	578,1375	920,605
WT_Meso	10m	1	P2	fémur	378,7235	920,605
WT_Meso	10m	1	P2	tibia	221,424	920,605
WT_Meso	10m	1	P2	tarse	142,1605	920,605
WT_Meso	10m	1	P2	total	742,308	920,605
WT_Meso	10m	1	P3	fémur	601,8895	920,605
WT_Meso	10m	1	P3	tibia	429,691	920,605
WT_Meso	10m	1	P3	tarse	185,0115	920,605
WT_Meso	10m	1	P3	total	1216,592	920,605
ftz-f1	5f	1	P1	fémur	363,124	1374,344
ftz-f1	5f	1	P1	tibia	291,8115	1374,344
ftz-f1	5f	1	P1	tarse	233,788	1374,344
ftz-f1	5f	1	P1	total	888,7235	1374,344
ftz-f1	5f	1	P2	fémur	538,992	1374,344
ftz-f1	5f	1	P2	tibia	804,8895	1374,344
ftz-f1	5f	1	P2	tarse	921,4975	1374,344
ftz-f1	5f	1	P2	total	2265,379	1374,344
ftz-f1	5f	1	P3	fémur	514,816	1374,344
ftz-f1	5f	1	P3	tibia	446,6005	1374,344
ftz-f1	5f	1	P3	tarse	434,7345	1374,344
ftz-f1	5f	1	P3	total	1396,151	1374,344
ftz-f1	7f	1	P1	fémur	384,012	1421,635
ftz-f1	7f	1	P1	tibia	342,272	1421,635
ftz-f1	7f	1	P1	tarse	211,7425	1421,635
ftz-f1	7f	1	P1	total	938,0265	1421,635
ftz-f1	7f	1	P2	fémur	544,9065	1421,635
ftz-f1	7f	1	P2	tibia	738,0055	1421,635
ftz-f1	7f	1	P2	tarse	746,5645	1421,635
ftz-f1	7f	1	P2	total	2029,4765	1421,635
ftz-f1	7f	1	P3	fémur	527,7995	1421,635
ftz-f1	7f	1	P3	tibia	448,705	1421,635
ftz-f1	7f	1	P3	tarse	410,0305	1421,635
ftz-f1	7f	1	P3	total	1386,535	1421,635
ftz-f1	8f	1	P1	fémur	334,312	1391,188
ftz-f1	8f	1	P1	tibia	348,063	1391,188

ftz-f1	8f	1	P1	tarse	233,115	1391,188
ftz-f1	8f	1	P1	total	915,49	1391,188
ftz-f1	8f	1	P2	fémur	558,0875	1391,188
ftz-f1	8f	1	P2	tibia	793,143	1391,188
ftz-f1	8f	1	P2	tarse	783,3105	1391,188
ftz-f1	8f	1	P2	total	2134,541	1391,188
ftz-f1	8f	1	P3	fémur	540,4185	1391,188
ftz-f1	8f	1	P3	tibia	418,339	1391,188
ftz-f1	8f	1	P3	tarse	396,363	1391,188
ftz-f1	8f	1	P3	total	1355,1205	1391,188
ftz-f1	9f	1	P1	fémur	424,1525	1362,448
ftz-f1	9f	1	P1	tibia	352,848	1362,448
ftz-f1	9f	1	P1	tarse	214,5525	1362,448
ftz-f1	9f	1	P1	total	991,553	1362,448
ftz-f1	9f	1	P2	fémur	589,853	1362,448
ftz-f1	9f	1	P2	tibia	734,162	1362,448
ftz-f1	9f	1	P2	tarse	757,1925	1362,448
ftz-f1	9f	1	P2	total	2081,2075	1362,448
ftz-f1	9f	1	P3	fémur	562,355	1362,448
ftz-f1	9f	1	P3	tibia	425,0435	1362,448
ftz-f1	9f	1	P3	tarse	459,5805	1362,448
ftz-f1	9f	1	P3	total	1446,979	1362,448
ftz-f1	10f	1	P1	fémur	330,856	1305,371
ftz-f1	10f	1	P1	tibia	327,7555	1305,371
ftz-f1	10f	1	P1	tarse	206,3655	1305,371
ftz-f1	10f	1	P1	total	864,977	1305,371
ftz-f1	10f	1	P2	fémur	533,722	1305,371
ftz-f1	10f	1	P2	tibia	715,2185	1305,371
ftz-f1	10f	1	P2	tarse	702,369	1305,371
ftz-f1	10f	1	P2	total	1951,3095	1305,371
ftz-f1	10f	1	P3	fémur	513,1345	1305,371
ftz-f1	10f	1	P3	tibia	402,4215	1305,371
ftz-f1	10f	1	P3	tarse	397,6915	1305,371
ftz-f1	10f	1	P3	total	1313,2475	1305,371
ftz-f1	11f	1	P1	fémur	337,5145	1407,801
ftz-f1	11f	1	P1	tibia	335,3515	1407,801
ftz-f1	11f	1	P1	tarse	215,058	1407,801
ftz-f1	11f	1	P1	total	887,924	1407,801
ftz-f1	11f	1	P2	fémur	523,8045	1407,801
ftz-f1	11f	1	P2	tibia	721,7325	1407,801
ftz-f1	11f	1	P2	tarse	768,2485	1407,801
ftz-f1	11f	1	P2	total	2013,7855	1407,801
ftz-f1	11f	1	P3	fémur	509,8	1407,801
ftz-f1	11f	1	P3	tibia	457,495	1407,801
ftz-f1	11f	1	P3	tarse	424,207	1407,801
ftz-f1	11f	1	P3	total	1391,502	1407,801

ftz-f1	12f	1	P1	fémur	353,833	1480,779
ftz-f1	12f	1	P1	tibia	353,2085	1480,779
ftz-f1	12f	1	P1	tarse	209,6535	1480,779
ftz-f1	12f	1	P1	total	916,695	1480,779
ftz-f1	12f	1	P2	fémur	592,571	1480,779
ftz-f1	12f	1	P2	tibia	768,2665	1480,779
ftz-f1	12f	1	P2	tarse	820,8175	1480,779
ftz-f1	12f	1	P2	total	2181,655	1480,779
ftz-f1	12f	1	P3	fémur	608,1705	1480,779
ftz-f1	12f	1	P3	tibia	446,479	1480,779
ftz-f1	12f	1	P3	tarse	431,152	1480,779
ftz-f1	12f	1	P3	total	1485,8015	1480,779
ftz-f1	13f	1	P1	fémur	366,173	1445,52
ftz-f1	13f	1	P1	tibia	351,473	1445,52
ftz-f1	13f	1	P1	tarse	219,11	1445,52
ftz-f1	13f	1	P1	total	936,756	1445,52
ftz-f1	13f	1	P2	fémur	577,689	1445,52
ftz-f1	13f	1	P2	tibia	787,731	1445,52
ftz-f1	13f	1	P2	tarse	812,668	1445,52
ftz-f1	13f	1	P2	total	2178,088	1445,52
ftz-f1	13f	1	P3	fémur	588,326	1445,52
ftz-f1	13f	1	P3	tibia	398,705	1445,52
ftz-f1	13f	1	P3	tarse	417,455	1445,52
ftz-f1	13f	1	P3	total	1404,486	1445,52
ftz-f1	14f	1	P1	fémur	367,2495	1401,117
ftz-f1	14f	1	P1	tibia	354,3365	1401,117
ftz-f1	14f	1	P1	tarse	200,8165	1401,117
ftz-f1	14f	1	P1	total	922,4025	1401,117
ftz-f1	14f	1	P2	fémur	578,9745	1401,117
ftz-f1	14f	1	P2	tibia	845,163	1401,117
ftz-f1	14f	1	P2	tarse	704,9245	1401,117
ftz-f1	14f	1	P2	total	2129,062	1401,117
ftz-f1	14f	1	P3	fémur	538,4255	1401,117
ftz-f1	14f	1	P3	tibia	419,1235	1401,117
ftz-f1	14f	1	P3	tarse	479,9565	1401,117
ftz-f1	14f	1	P3	total	1437,5055	1401,117
ftz-f1	15f	1	P1	fémur	318,8665	1382,32
ftz-f1	15f	1	P1	tibia	333,761	1382,32
ftz-f1	15f	1	P1	tarse	214,438	1382,32
ftz-f1	15f	1	P1	total	867,0655	1382,32
ftz-f1	15f	1	P2	fémur	529,4045	1382,32
ftz-f1	15f	1	P2	tibia	771,2325	1382,32
ftz-f1	15f	1	P2	tarse	722,964	1382,32
ftz-f1	15f	1	P2	total	2023,601	1382,32
ftz-f1	15f	1	P3	fémur	514,6385	1382,32
ftz-f1	15f	1	P3	tibia	426,8345	1382,32

ftz-f1	15f	1	P3	tarse	421,488	1382,32
ftz-f1	15f	1	P3	total	1362,961	1382,32
ftz-f1	16f	1	P1	fémur	346,3205	1435,163
ftz-f1	16f	1	P1	tibia	335,6555	1435,163
ftz-f1	16f	1	P1	tarse	204,747	1435,163
ftz-f1	16f	1	P1	total	886,723	1435,163
ftz-f1	16f	1	P2	fémur	602,5635	1435,163
ftz-f1	16f	1	P2	tibia	730,96	1435,163
ftz-f1	16f	1	P2	tarse	838,018	1435,163
ftz-f1	16f	1	P2	total	2171,5415	1435,163
ftz-f1	16f	1	P3	fémur	569,7215	1435,163
ftz-f1	16f	1	P3	tibia	473,638	1435,163
ftz-f1	16f	1	P3	tarse	421,7075	1435,163
ftz-f1	16f	1	P3	total	860,03	1435,163
Iro-like	1i	1	P1	fémur	344,579	1425,838
Iro-like	1i	1	P1	tibia	307,98	1425,838
Iro-like	1i	1	P1	tarse	199,735	1425,838
Iro-like	1i	1	P1	total	852,294	1425,838
Iro-like	1i	1	P2	fémur	521,406	1425,838
Iro-like	1i	1	P2	tibia	720,378	1425,838
Iro-like	1i	1	P2	tarse	630,254	1425,838
Iro-like	1i	1	P2	total	1872,038	1425,838
Iro-like	1i	1	P3	fémur	504,738	1425,838
Iro-like	1i	1	P3	tibia	403,849	1425,838
Iro-like	1i	1	P3	tarse	357,78	1425,838
Iro-like	1i	1	P3	total	1266,367	1425,838
Iro-like	2i	1	P1	fémur	324,23	1403,084
Iro-like	2i	1	P1	tibia	310,282	1403,084
Iro-like	2i	1	P1	tarse	202,364	1403,084
Iro-like	2i	1	P1	total	836,876	1403,084
Iro-like	2i	1	P2	fémur	520,902	1403,084
Iro-like	2i	1	P2	tibia	730,473	1403,084
Iro-like	2i	1	P2	tarse	673,305	1403,084
Iro-like	2i	1	P2	total	1924,68	1403,084
Iro-like	2i	1	P3	fémur	544,138	1403,084
Iro-like	2i	1	P3	tibia	418,297	1403,084
Iro-like	2i	1	P3	tarse	391,347	1403,084
Iro-like	2i	1	P3	total	1353,782	1403,084
Iro-like	3i	1	P1	fémur	NA	1416,315
Iro-like	3i	1	P1	tibia	NA	1416,315
Iro-like	3i	1	P1	tarse	NA	1416,315
Iro-like	3i	1	P1	total	NA	1416,315
Iro-like	3i	1	P2	fémur	483,821	1416,315
Iro-like	3i	1	P2	tibia	766,77	1416,315
Iro-like	3i	1	P2	tarse	725,663	1416,315
Iro-like	3i	1	P2	total	1976,254	1416,315

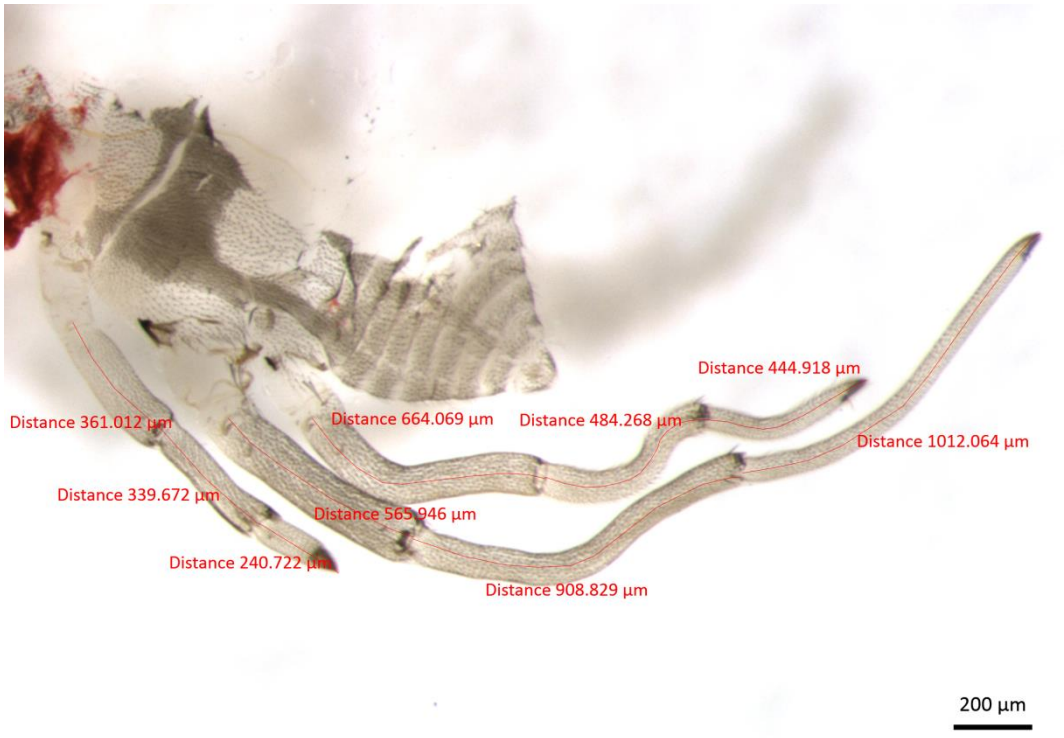
Iro-like	3i	1	P3	fémur	485,998	1416,315
Iro-like	3i	1	P3	tibia	413,784	1416,315
Iro-like	3i	1	P3	tarse	389,121	1416,315
Iro-like	3i	1	P3	total	1288,903	1416,315
Iro-like	4i	1	P1	fémur	339,566	1429,882
Iro-like	4i	1	P1	tibia	303,057	1429,882
Iro-like	4i	1	P1	tarse	187,44	1429,882
Iro-like	4i	1	P1	total	830,063	1429,882
Iro-like	4i	1	P2	fémur	472,615	1429,882
Iro-like	4i	1	P2	tibia	629,648	1429,882
Iro-like	4i	1	P2	tarse	657,091	1429,882
Iro-like	4i	1	P2	total	1759,354	1429,882
Iro-like	4i	1	P3	fémur	437,971	1429,882
Iro-like	4i	1	P3	tibia	421,421	1429,882
Iro-like	4i	1	P3	tarse	386,762	1429,882
Iro-like	4i	1	P3	total	1246,154	1429,882
Iro-like	5i	1	P1	fémur	NA	1430,672
Iro-like	5i	1	P1	tibia	NA	1430,672
Iro-like	5i	1	P1	tarse	NA	1430,672
Iro-like	5i	1	P1	total	NA	1430,672
Iro-like	5i	1	P2	fémur	528,13	1430,672
Iro-like	5i	1	P2	tibia	757,05	1430,672
Iro-like	5i	1	P2	tarse	728,873	1430,672
Iro-like	5i	1	P2	total	2014,053	1430,672
Iro-like	5i	1	P3	fémur	485,18	1430,672
Iro-like	5i	1	P3	tibia	423,143	1430,672
Iro-like	5i	1	P3	tarse	416,036	1430,672
Iro-like	5i	1	P3	total	1324,359	1430,672
Iro-like	6i	1	P1	fémur	302,711	1374,105
Iro-like	6i	1	P1	tibia	279,674	1374,105
Iro-like	6i	1	P1	tarse	186,996	1374,105
Iro-like	6i	1	P1	total	769,381	1374,105
Iro-like	6i	1	P2	fémur	468,357	1374,105
Iro-like	6i	1	P2	tibia	575,493	1374,105
Iro-like	6i	1	P2	tarse	593,351	1374,105
Iro-like	6i	1	P2	total	1637,201	1374,105
Iro-like	6i	1	P3	fémur	443,567	1374,105
Iro-like	6i	1	P3	tibia	313,062	1374,105
Iro-like	6i	1	P3	tarse	349,745	1374,105
Iro-like	6i	1	P3	total	1106,374	1374,105
Iro-like	7i	1	P1	fémur	304,284	1400,031
Iro-like	7i	1	P1	tibia	301,867	1400,031
Iro-like	7i	1	P1	tarse	194,973	1400,031
Iro-like	7i	1	P1	total	801,124	1400,031
Iro-like	7i	1	P2	fémur	442,329	1400,031
Iro-like	7i	1	P2	tibia	755,717	1400,031

Iro-like	7i	1	P2	tarse	676,765	1400,031
Iro-like	7i	1	P2	total	1874,811	1400,031
Iro-like	7i	1	P3	fémur	515,215	1400,031
Iro-like	7i	1	P3	tibia	409,267	1400,031
Iro-like	7i	1	P3	tarse	391,426	1400,031
Iro-like	7i	1	P3	total	1315,908	1400,031
Iro-like	8i	1	P1	fémur	327,054	1404,404
Iro-like	8i	1	P1	tibia	256,024	1404,404
Iro-like	8i	1	P1	tarse	197,176	1404,404
Iro-like	8i	1	P1	total	780,254	1404,404
Iro-like	8i	1	P2	fémur	490,666	1404,404
Iro-like	8i	1	P2	tibia	669,194	1404,404
Iro-like	8i	1	P2	tarse	654,497	1404,404
Iro-like	8i	1	P2	total	1814,357	1404,404
Iro-like	8i	1	P3	fémur	495,595	1404,404
Iro-like	8i	1	P3	tibia	404,064	1404,404
Iro-like	8i	1	P3	tarse	384,522	1404,404
Iro-like	8i	1	P3	total	1284,181	1404,404
Iro-like	9i	1	P1	fémur	338,734	1408,203
Iro-like	9i	1	P1	tibia	318,375	1408,203
Iro-like	9i	1	P1	tarse	201,367	1408,203
Iro-like	9i	1	P1	total	858,476	1408,203
Iro-like	9i	1	P2	fémur	547,708	1408,203
Iro-like	9i	1	P2	tibia	798,369	1408,203
Iro-like	9i	1	P2	tarse	812,391	1408,203
Iro-like	9i	1	P2	total	2158,468	1408,203
Iro-like	9i	1	P3	fémur	566,126	1408,203
Iro-like	9i	1	P3	tibia	461,71	1408,203
Iro-like	9i	1	P3	tarse	437,736	1408,203
Iro-like	9i	1	P3	total	1465,572	1408,203
Iro-like	10i	1	P1	fémur	317,246	1404,767
Iro-like	10i	1	P1	tibia	269,119	1404,767
Iro-like	10i	1	P1	tarse	199,803	1404,767
Iro-like	10i	1	P1	total	786,168	1404,767
Iro-like	10i	1	P2	fémur	484,403	1404,767
Iro-like	10i	1	P2	tibia	543,922	1404,767
Iro-like	10i	1	P2	tarse	587,669	1404,767
Iro-like	10i	1	P2	total	1615,994	1404,767
Iro-like	10i	1	P3	fémur	490,302	1404,767
Iro-like	10i	1	P3	tibia	371,984	1404,767
Iro-like	10i	1	P3	tarse	372,251	1404,767
Iro-like	10i	1	P3	total	1234,537	1404,767

Annexe 25 : Photo représentant la mesure du corps pour A. paludum sauvage



Annexe 26 : Photo représentant les mesures des segments des pattes pour A. paludum sauvage



ÉCOLE PRATIQUE DES HAUTES ÉTUDES SCIENCES DE LA VIE ET DE LA TERRE

Etude de gènes impliqués dans la croissance des pattes et dans la segmentation antéro-postérieure des embryons de Gerridae.

Decaras Amélie

Date de soutenance : 05/12/17

RÉSUMÉ

L'étude de la diversité des espèces est l'une des questions fondamentale de la recherche en biologie évolutive. L'étude des espèces nous permet d'une part de mettre en avant une meilleure compréhension de la biologie des espèces mais aussi des mécanismes génétiques et développementaux qui régissent tous les êtres vivants. Plusieurs facteurs peuvent influencer les différences phénotypiques entre les espèces. L'objectif principal de notre laboratoire étant de comprendre les mécanismes génétiques responsables de cette diversité. Dans ce projet nous utilisons les insectes semi-aquatiques (Gerromorpha) qui ont réussi à coloniser la surface de l'eau, puis à se diversifier pour compter actuellement environs deux-cents espèces. **Notre recherche étant de mieux comprendre les modifications génétiques et morphologiques qui ont permis à ces espèces de s'adapter à ce nouvel habitat.**

Notre première étude s'est portée plus précisément sur une famille de Gerromorpha : les Gerridae. Cette famille présente en plus d'une augmentation générale de la taille des pattes (spécifique des Gerromorpha) un changement de plan d'organisation des pattes avec la seconde paire de pattes qui est devenu plus grande que la troisième. L'objectif de notre étude est de déterminer qu'elles sont les bases génétiques et développementales qui expliquent ce changement phénotypique. Une analyse de transcriptomique comparative des gènes exprimés dans la seconde et troisième paire de patte, durant l'embryogénèse, nous a permis de mettre en lumière quatre gènes probablement associés avec la croissance des pattes : un gène de la famille Sp, un gène de la famille Iroquois, le cofacteur de *fushi tarazu (ftz-f1)* et *facteur de transcription AP-2 (TfAp-2)*. Nous montrons également que l'effet de certains de ces gènes semble spécifique de certains segments. Cela rappelle que la croissance des pattes et le changement de plan d'organisation des pattes des Gerromorpha a pu évolué par des changements qui peuvent être spécifiques de chaque segment.

Notre seconde étude, en collaboration avec d'autres équipes de recherche, s'est portée sur l'identification de la fonction d'un groupe de gènes chez les Gerridae. **Le but étant de comparer le rôle de ce groupe de gènes entre différentes espèces d'arthropodes afin de déterminer sa fonction ancestrale.** Dans cette étude nous montrons que le gène *shavenbaby (svb), polished rice peptides (pri)*, *ubiquitin protein ligase E3 (Ubr3),* connu pour leurs rôles dans la formation de trichrome chez *D. melanogaster*, joue un rôle primordial dans la segmentation antero-postérieure de *G. buenoi* (Hemiptera), *d'O. fasciatus* (Hemiptera), de *T. castaneum* (Coleoptera), et de *N. vitripennis* (Hymenoptera). En association avec de nouvelles fonctions décrites chez *D. melanosgaster* ces résultats suggèrent que ce groupe de gènes était initialement requis pour la segmentation antéro-postérieure des arthropodes, fonction qui aurait ensuite, été potentiellement perdue chez *D. melanogaster.*

MOTS-CLÉS: *Gerromorpha, Diversité, adaptation, développement, segmentation, génétique, phénotypique*