

# Validation de gènes de référence pour la RT-qPCR chez les grillons d'élevage : implications pour la santé et la biosécurité des systèmes de production



Présentée par  
**Dre Houda Ben-Miled**

**Directrice**  
**Pre Marie-Odile Benoit-Biancamano**  
**Co-directeur**  
**Pr François Meurens**

# Introduction

Mise en contexte

**En 2013 – Rapport FAO**



**Food and Agriculture  
Organization of the  
United Nations**

- L'entomophagie comme solution durable pour nourrir la planète
- Catalyseur du développement mondial
- Expansion des élevages au Canada

# Introduction

## Enjeux sanitaires en élevage de grillons

### Infections entomopathogènes

→ impact sur la production

### Pertes économiques

→ risque pour la filière

### Surveillance microbiologique

→ essentielle pour la biosécurité

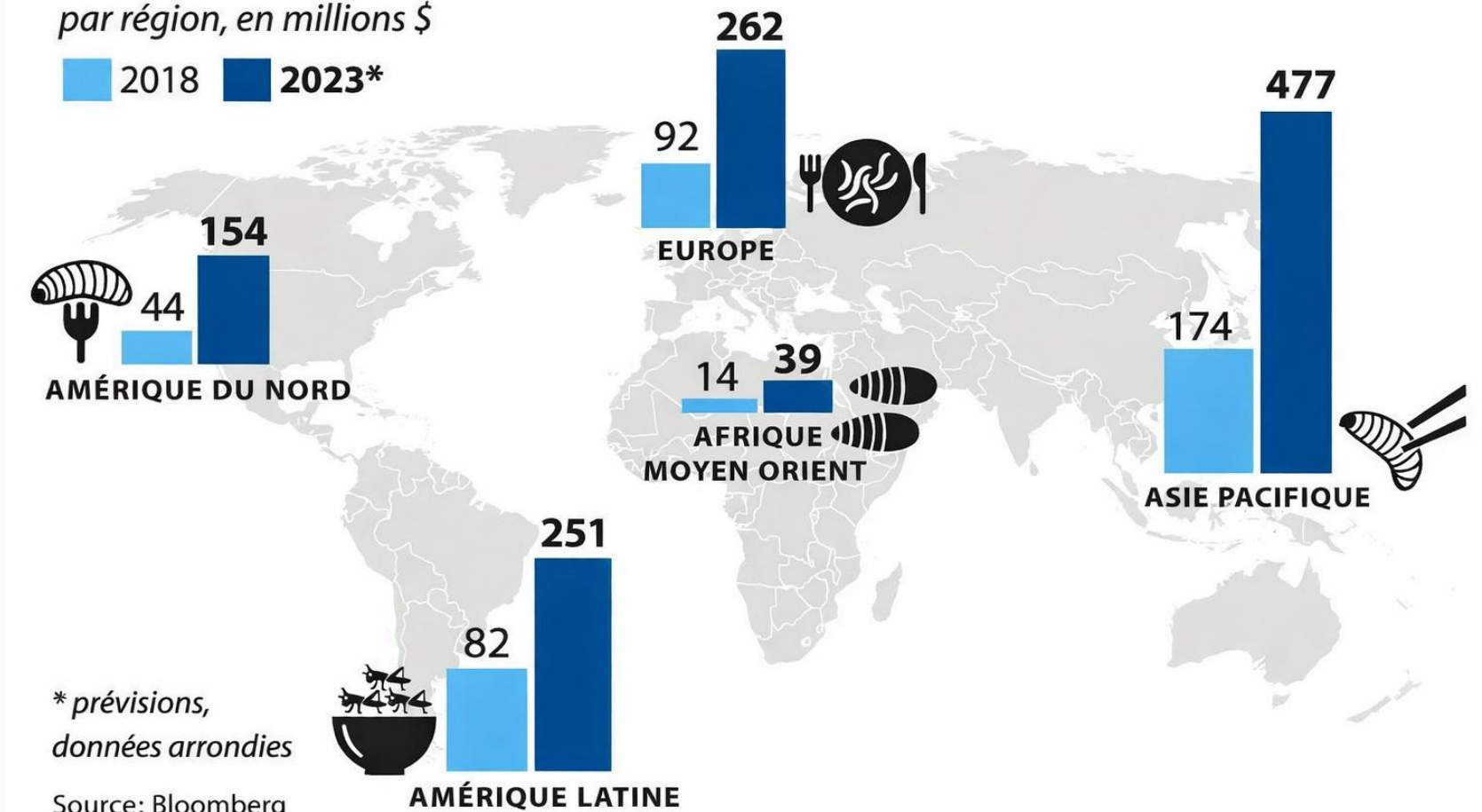


**Outils diagnostiques encore limités**

### LES INSECTES DANS NOTRE ALIMENTATION

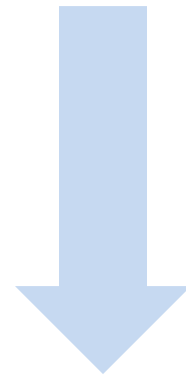
Estimation du chiffre d'affaires du marché des insectes comestibles  
par région, en millions \$

■ 2018 ■ 2023\*



(La Libre Belgique, 2021)

**Hypothèse:** La RT-qPCR, en utilisant des gènes de référence stable, permet de détecter de façon fiable les changements de la réponse immunitaire des insectes et donc d'évaluer leur état sanitaire.



**Objectif 1:** Identifier et valider des gènes de référence stable pour la RT-qPCR

**Objectif 2:** Identifier de nouvelles cibles moléculaires métaboliques et immunologiques chez les grillons domestiques

**Objectif 3:** Valider ces cibles en conditions infectieuses et non infectieuses



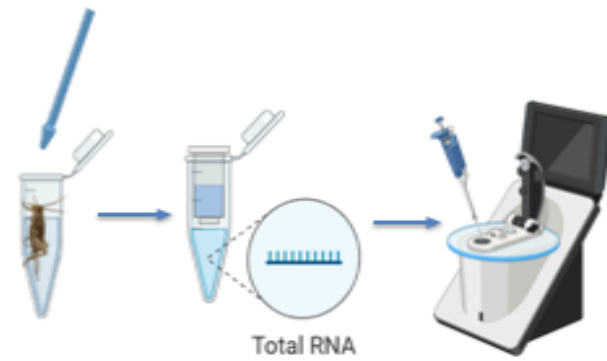
# Matériel & Méthodes

## Conception des amorces

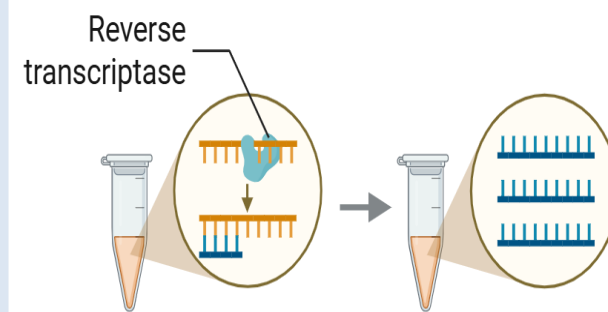


Forward primer	5' GCTAAATGTTCAAGGCTGTGG 3'
Reverse primer	5' GGAATCAAACGGAATGACCG 3'

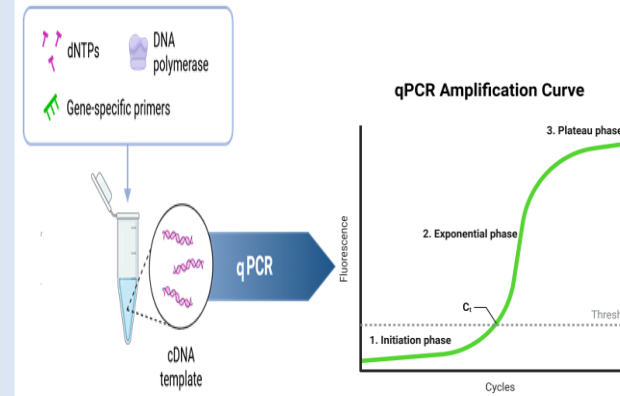
## Extraction d'ARN



## RT (Transcription inverse)



## qPCR



## Analyse des données



# Matériel & Méthodes

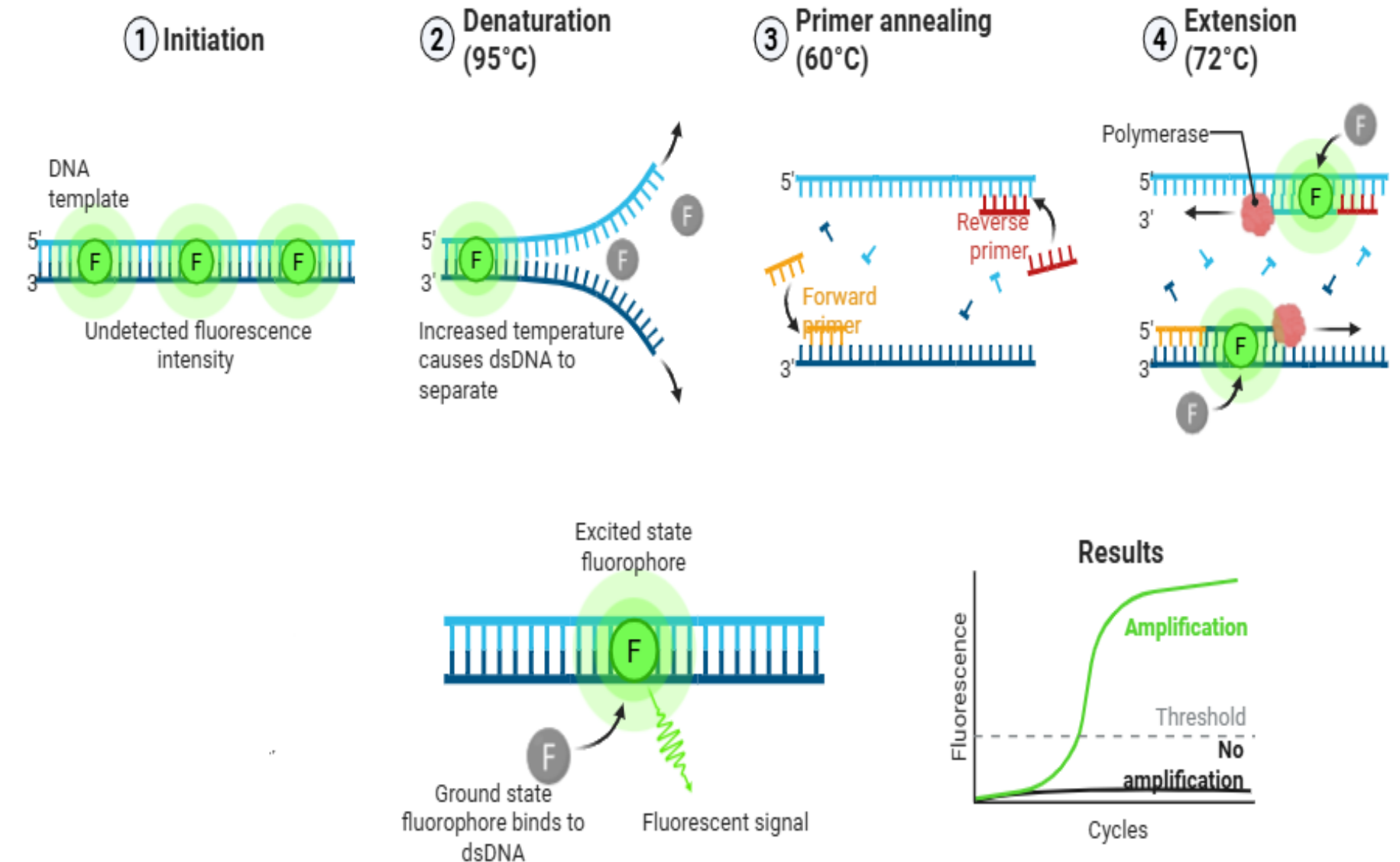
## RT-qPCR (Réaction de polymérisation en chaîne quantitative après transcription inverse)

- Permet de quantifier l'expression des gènes

### 1) Transcription inverse (RT)



### 2) Amplification (qPCR)



# Matériel & Méthodes

**RT-qPCR** (Réaction de polymérisation en chaîne quantitative après transcription inverse)

➤ Permet de quantifier l'expression des gènes

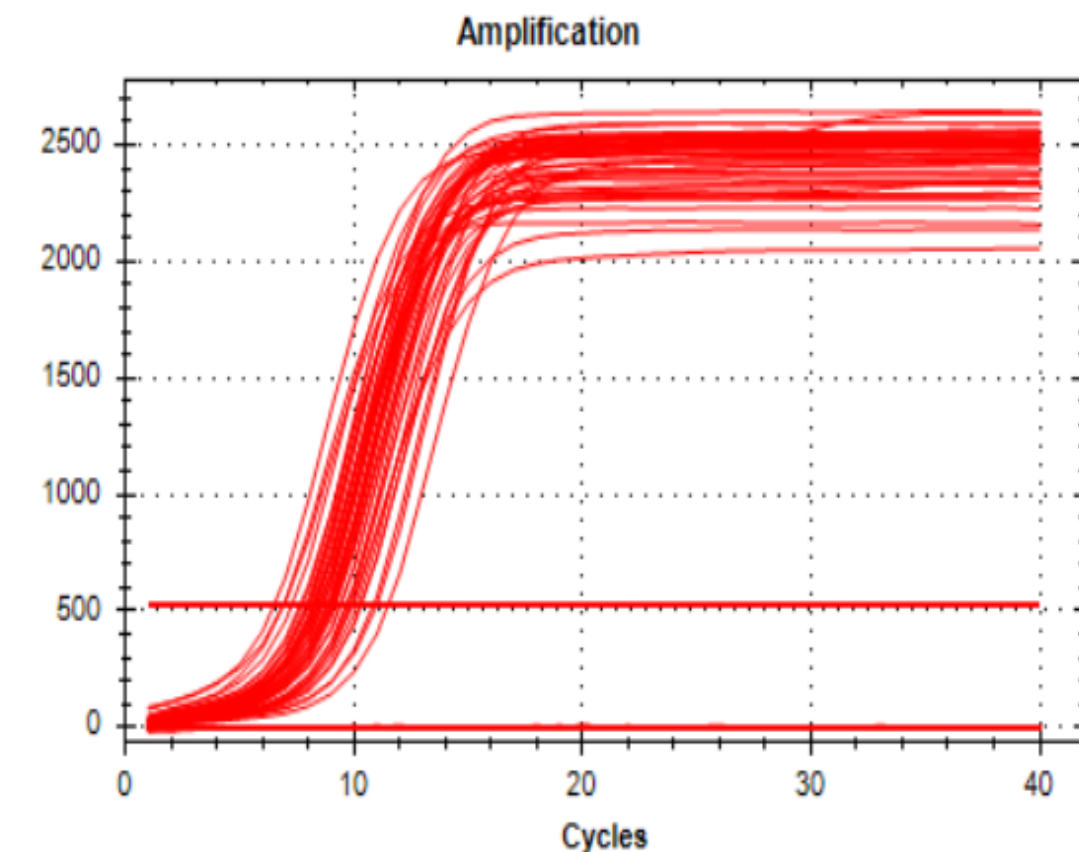
1) Transcription inverse (RT)

2) Amplification (qPCR)

3) Détection (Cq)

- La machine mesure la fluorescence à chaque cycle.
- On obtient une valeur appelée **Cq (Cycle quantitative)** :
  - **Cq bas** → beaucoup d'ARN initial: forte expression
  - **Cq élevé** → peu d'ARN initial: faible expression

Well	Fluor	Content	Cq
A02	SYBR	Unkn	8.39
A03	SYBR	Unkn	9.63
A04	SYBR	Unkn	11.45
A05	SYBR	Unkn	8.84
A06	SYBR	Unkn	9.09
A07	SYBR	Unkn	9.17
A08	SYBR	Unkn	10.26
B01	SYBR	Unkn	9.62
B02	SYBR	Unkn	10.80
B03	SYBR	Unkn	9.75
B04	SYBR	Unkn	8.23
B05	SYBR	Unkn	8.25



# Résultats

**Tableau 1** : Gènes de référence candidats chez *A. domesticus* et *G. sigillatus*

## *Acheta domesticus*

Symbole du gène	Nom du gène	Séquences des amorces (5'-3')	N. d'accèsion ou référence
<b>AdoNEOPT</b>	<i>AdoNEOPT protein kinase mRNA</i>	F : AGCCCTGGACCTGATGAAAG R : TTGCTGGTGGTGTGTTTGTGAG	GQ885473
<b>EF1<math>\alpha</math></b>	<i>Elongation factor 1-alpha</i>	F : GGAAATCAAGAAGGAAGTCAGC R : GGCATCCAAAGCCTCAATAAG	(Takacs et al., 2023)
<b>EF2</b>	<i>Elongation factor 2</i>	F : GGCTGGAGAAGCTTTACTAC R : CATCATGAGGCCCTTCATAC	GQ886709
<b>GAPDH</b>	<i>Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase</i>	F : CTCCTAACGTCTCTGTAGTG R : TCGGTGTATGCCAGAATTCC	J AHLJT010004567
<b>His H3</b>	<i>Histone H3</i>	F : AGAAGCCGCATCGTTACAGG R : ACGGACAAGACGCTGGAAAG	GU066907
<b>18S rRNA</b>	<i>18S ribosomal RNA</i>	F : CAGTCGTGACCCGAAAGG R : ATCAGCCCAAGGTTATCCAG	(Lu et al., 2022)

## *Grylloides sigillatus*

Symbole du gène	Nom du gène	Séquences des amorces (5'-3')	N. d'accèsion ou référence
<b>ACTB</b>	<i>Actin beta</i>	F: TCGGGATCTGACTGACTACC R: GCGACATAGCACAGCTTCTC	OM333731
<b>EF1</b>	<i>Elongation factor 1-alpha</i>	F: GCTGCTGTTGCTTTCGTTCC R: ACCACCATAACCAGGCTTGAG	OM333732
<b>GAPDH</b>	<i>Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase</i>	F: GTTTGGCACCTATTGCGAAG R: TCCAGAAGGACCATCAACAG	OM333729
<b>His H3</b>	<i>Histone H3</i>	F: AAGAAGCCGCATCGTTACAG R: ATGGATAGCGCACAAAGTTGG	KR903178
<b>RPL5</b>	<i>Ribosomal protein L5</i>	F: ACGCTTCTGCATACTGTACC R: CACCATCAACAGCACCTTTC	OM333728
<b>18S rRNA</b>	<i>18S ribosomal RNA</i>	F: CAGTCGTGACCCGAAAGG R: ATCAGCCCAAGGTTATCCAG	(Lu et al., 2022)

# Résultats

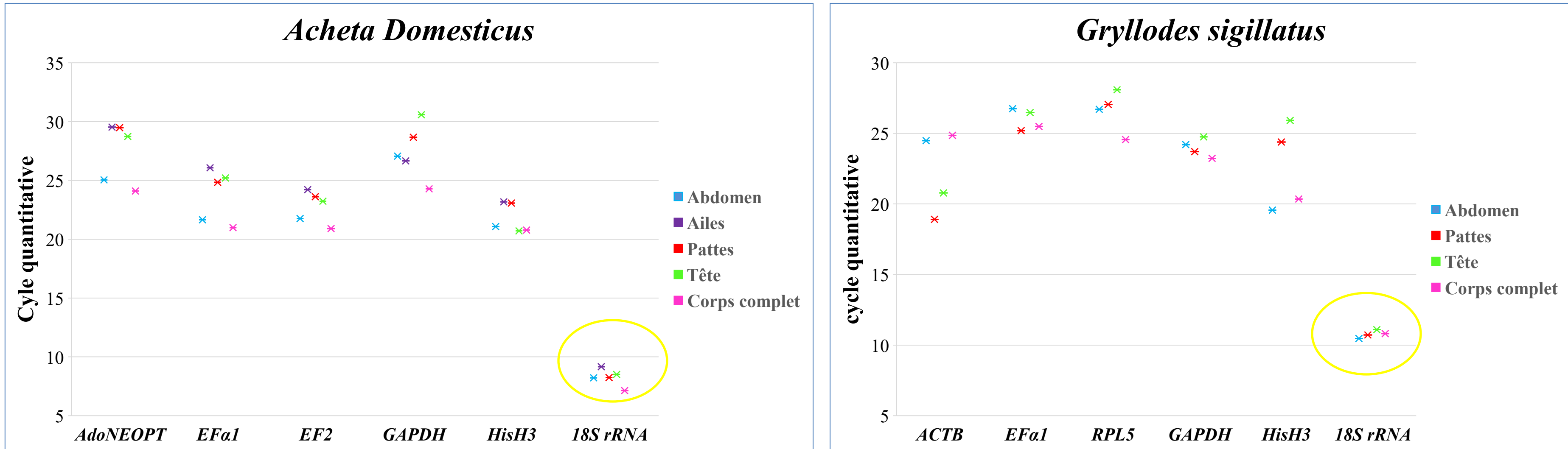
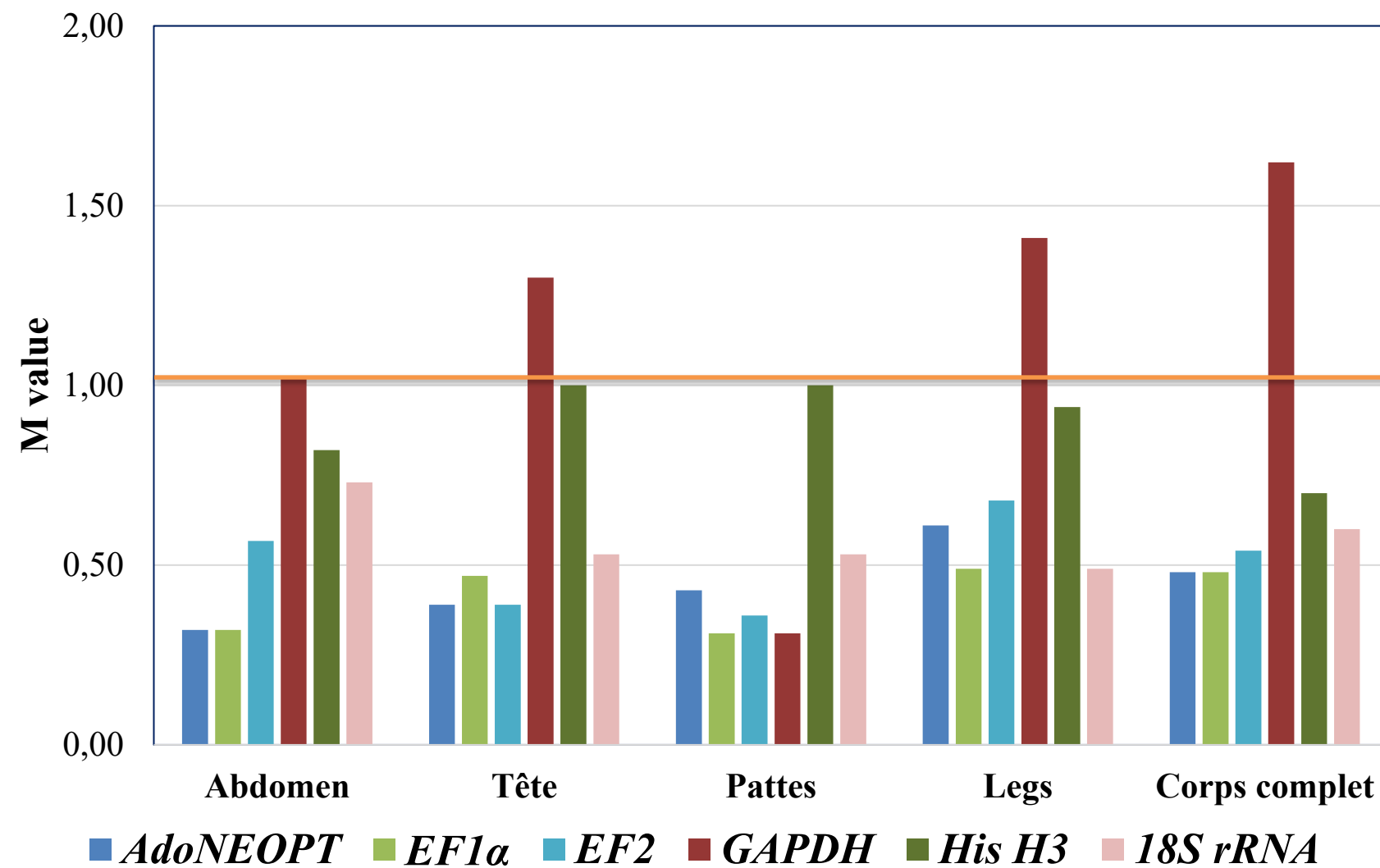


Figure 1 : Valeurs de Cq des gènes de référence chez deux espèces de grillons

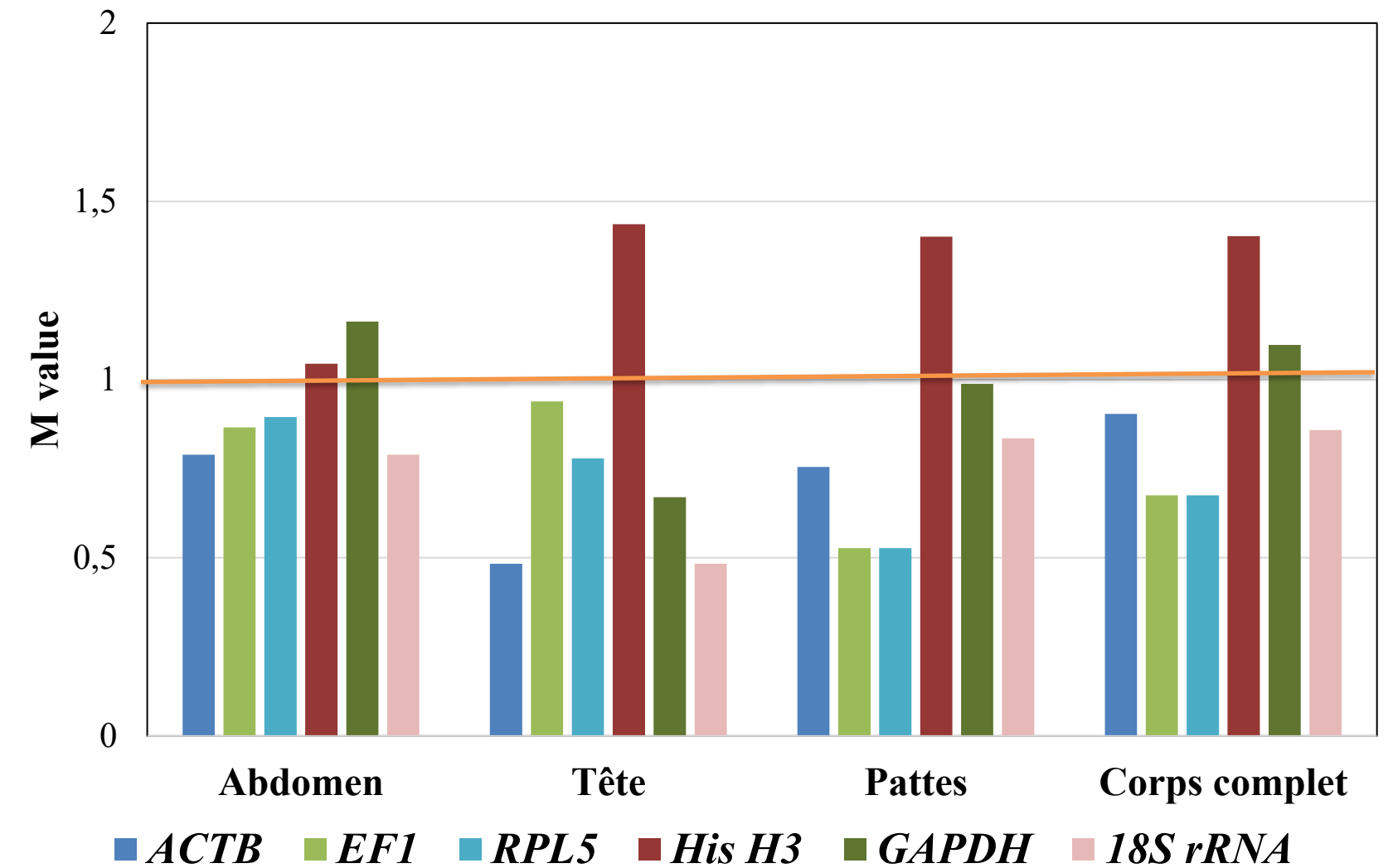
# Résultats

## Analyse geNorm des gènes de référence candidats

### *Acheta domesticus*



### *Grylloides sigillatus*

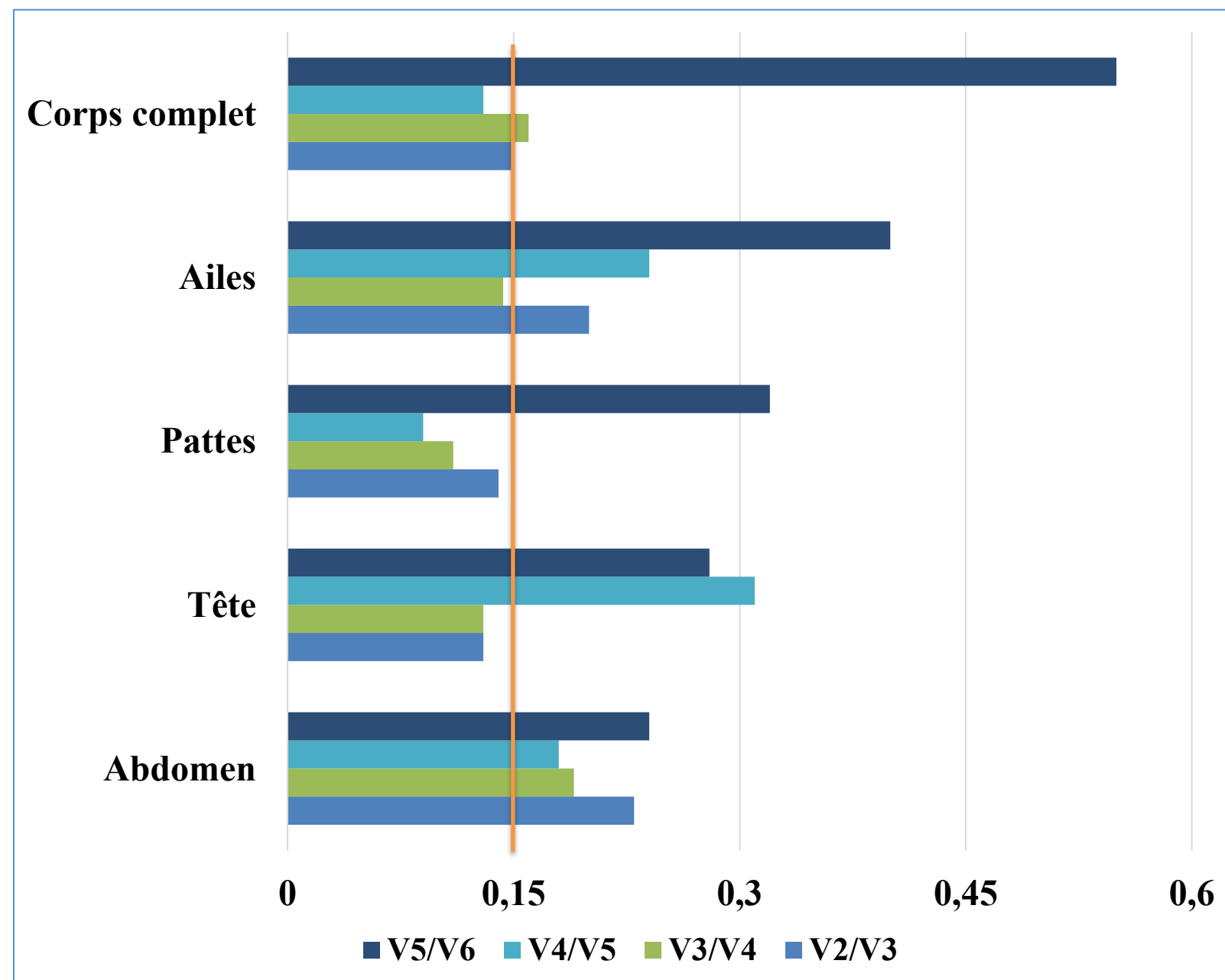


**Figure 2** : Valeurs moyennes de stabilité d'expression (M) calculées par geNorm pour six gènes de référence candidats à travers différents compartiments corporels et le corps entier du grillon.

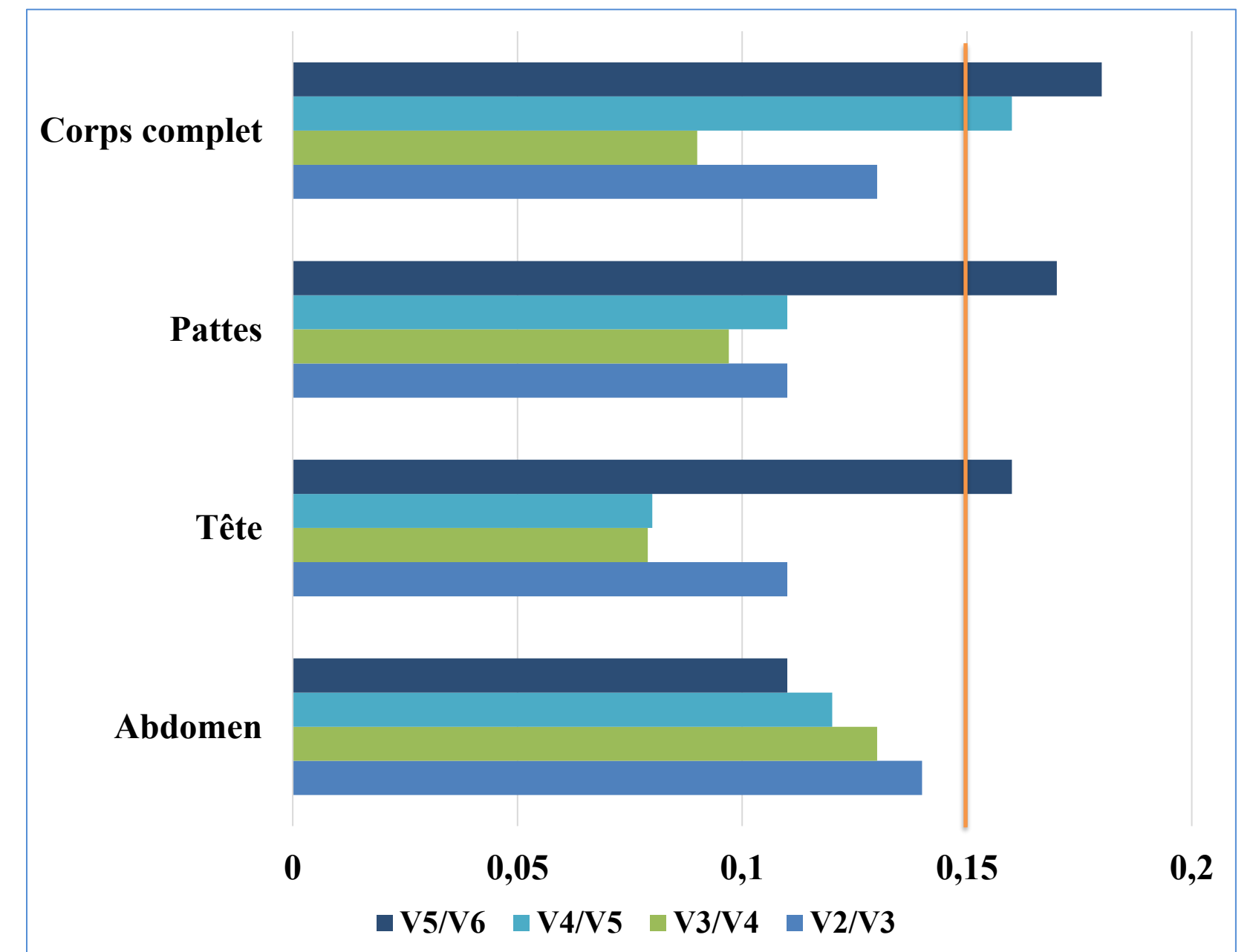
# Résultats

## Analyse des variations par paires

### *Acheta domesticus*



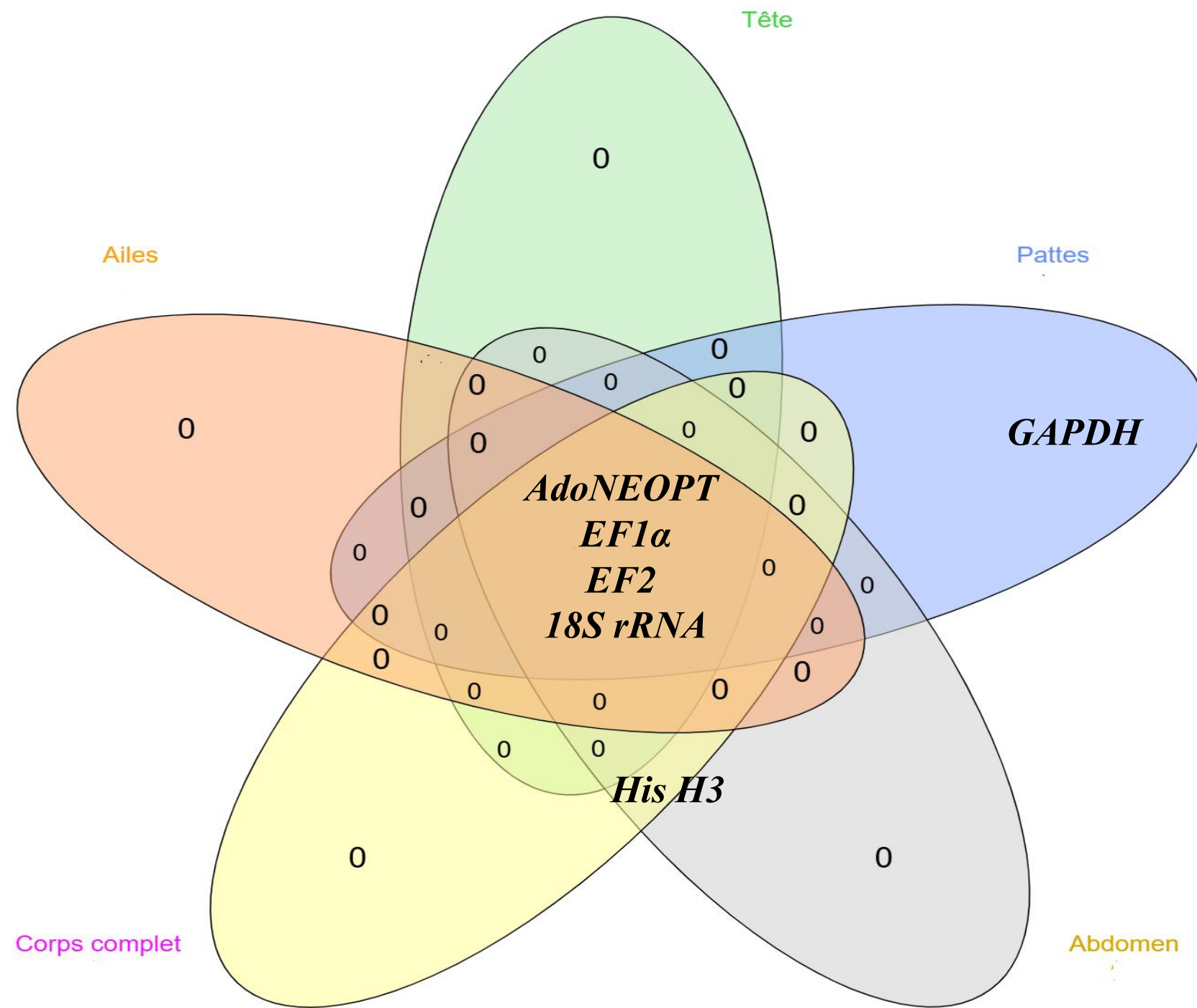
### *Gryllodes sigillatus*



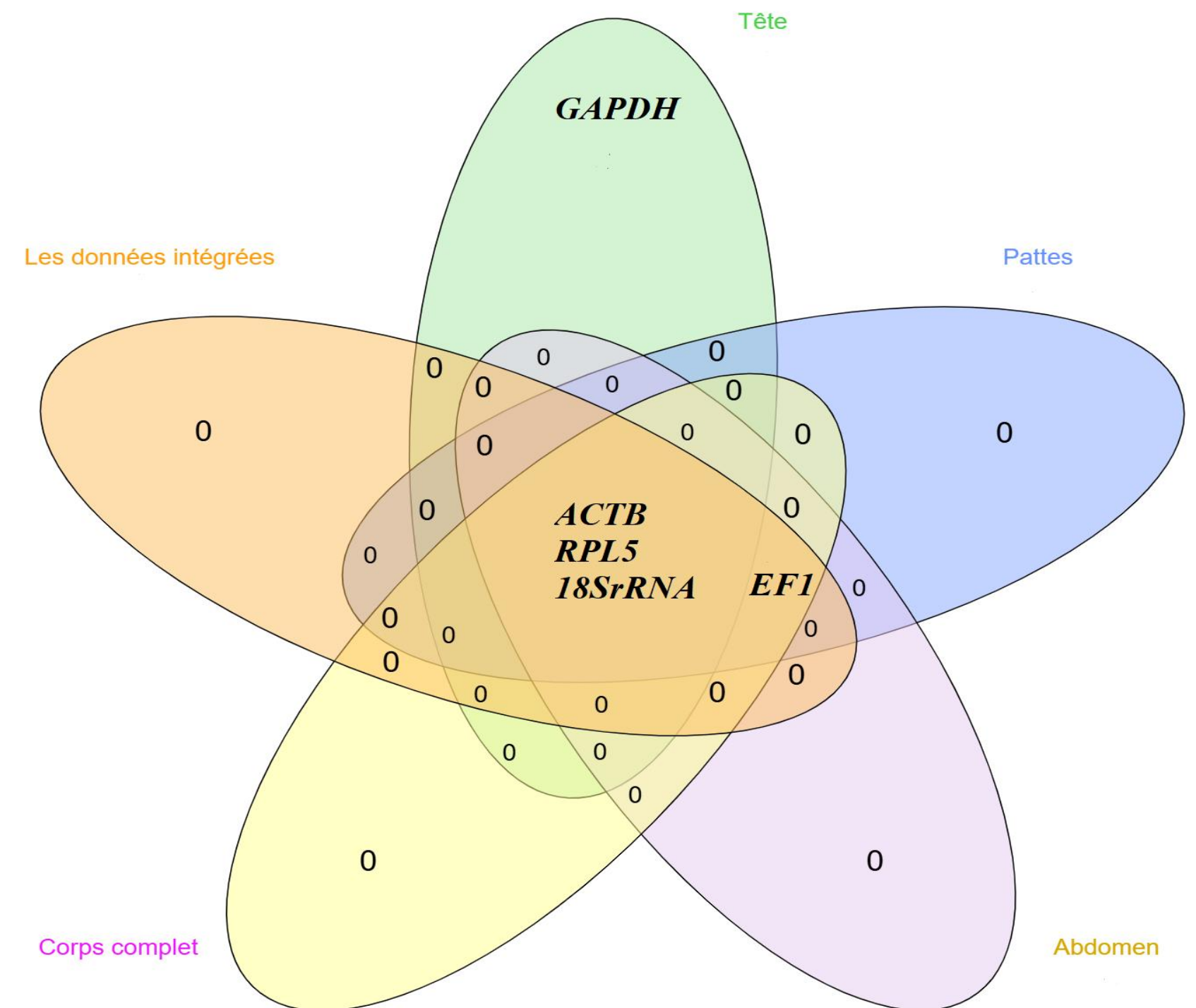
**Figure 3** : L'analyse des variations par paires, réalisée à l'aide du logiciel R, pour déterminer le nombre optimal de gènes de référence nécessaires à la normalisation des gènes cibles.

# Résultats

## *Acheta domesticus*



## *Gryllodes sigillatus*



**Figure 4 :** La stabilité d'expression des six gènes de référence a été évaluée avec **RefFinder**, qui combine plusieurs algorithmes pour établir un classement global.

# Conclusions & Perspectives

- Cette étude fournit la première validation de gènes de référence pour *Acheta domesticus* et *Gyllodes sigillatus*.
- Des outils de diagnostic rapides et ciblés sont essentiels pour le suivi sanitaire et la biosécurité des élevages d'insectes.
- La RT-qPCR, associée à des gènes de référence validés, peut devenir un outil clé pour le diagnostic et le suivi de la santé des insectes d'élevage.
- Étendre l'identification et la validation de gènes de référence à d'autres insectes d'élevage afin de disposer de marqueurs de normalisation fiables pour chaque espèce.

# Références

- <https://www.lapresse.ca/environnement/consommation/201305/13/01-4650282-la-fao-appelle-a-manger-des-insectes.php>
- Cohen, A. et E. Duchemin (2020). Fiche économique – fermes d'élevage d'insectes comestibles. Laboratoire sur l'agriculture urbaine/Carrefour de recherche, d'expertise et de transfert en agriculture urbaine. 34 p.
- Montowska, M., Kowalczewski, P. Ł., Rybicka, I., & Fornal, E. (2019). Nutritional value, protein and peptide composition of edible cricket powders. *Food chemistry*, 289, 130–138.
- La libre, 2021 <https://www.lalibre.be/planete/sante/2021/08/26/les-insectes-vont-ils-un-jour-nourrir-le-monde-FILC4ZB7H5FHTA73LWT56ZXN2U/>
- Lu, Y., Wang, Z., Lin, F., Ma, Y., Kang, J., Fu, Y., Huang, M., Zhao, Z., Zhang, J., Chen, Q., & Ren, B. (2022). Screening and identification of genes associated with flight muscle histolysis of the house cricket *Acheta domesticus*. *Frontiers in Physiology*, 13, 1079328
- Takacs, J., Bryon, A., Jensen, A. B., van Loon, J. J. A., & Ros, V. I. D. (2023). Effects of Temperature and Density on House Cricket Survival and Growth and on the Prevalence of *Acheta Domesticus* Densovirus. *Insects*, 14(7), 588.
- Bruel, T., Guibon, R., Melo, S., Guillén, N., Salmon, H., Girard-Misguich, F., & Meurens, F. (2010). Epithelial induction of porcine suppressor of cytokine signaling 2 (SOCS2) gene expression in response to *Entamoeba histolytica*. *Developmental and Comparative Immunology*, 34(5), 562–571.
- Bustin, S. A., Ruijter, J. M., van den Hoff, M. J. B., Kubista, M., Pfaffl, M. W., Shipley, G. L., Tran, N., Rödiger, S., Untergasser, A., Mueller, R., Nolan, T., Milavec, M., Burns, M. J., Huggett, J. F., Vandesompele, J., & Wittwer, C. T. (2025). MIQE 2.0: Revision of the Minimum Information for Publication of Quantitative Real-Time PCR Experiments Guidelines. *Clinical Chemistry*, 71(6), 634–651
- Andersen, C. L., Jensen, J. L., & Ørntoft, T. F. (2004). Normalization of Real-Time Quantitative Reverse Transcription-PCR Data: A Model-Based Variance Estimation Approach to Identify Genes Suited for Normalization, Applied to Bladder and Colon Cancer Data Sets. *Cancer Research*, 64(15), 5245–5250.
- Lü, J., Yang, C., Zhang, Y., & Pan, H. (2018). Selection of Reference Genes for the Normalization of RT-qPCR Data in Gene Expression Studies in Insects: A Systematic Review. *Frontiers in Physiology*, 9.
- Xie, F., Xiao, P., Chen, D., Xu, L., & Zhang, B. (2012). miRDeepFinder: A miRNA analysis tool for deep sequencing of plant small RNAs. *Plant Molecular Biology*, 80(1), 75–84.
- Zhu, X., Yuan, M., Shakeel, M., Zhang, Y., Wang, S., Wang, X., Zhan, S., Kang, T., & Li, J. (2014b). Selection and Evaluation of Reference Genes for Expression Analysis Using qRT-PCR in the Beet Armyworm *Spodoptera exigua* (Hübner) (*Lepidoptera: Noctuidae*). *PLOS ONE*, 9(1), e84730.
- Silver, N., Best, S., Jiang, J., & Thein, S. L. (2006). Selection of housekeeping genes for gene expression studies in human reticulocytes using real-time PCR. *BMC Molecular*
- Pfaffl, M. W., Tichopad, A., Prgomet, C., & Neuvians, T. P. (2004). Determination of stable housekeeping genes, differentially regulated target genes and sample integrity: BestKeeper – Excel-based tool using pair-wise correlations. *Biotechnology Letters*, 26(6), 509–515

# Merci pour votre attention

## Remerciements

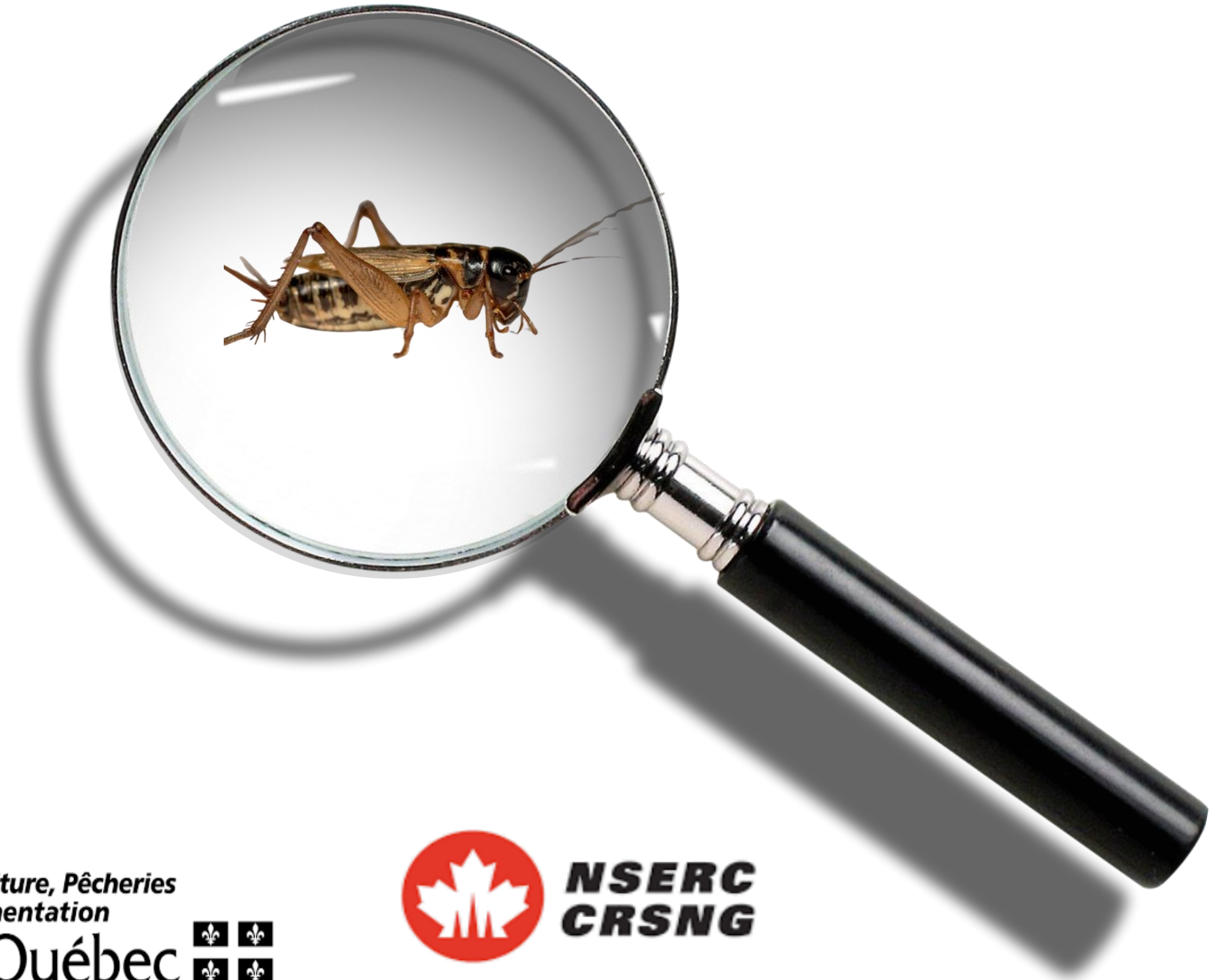
Pre Marie-Odile Benoit-Biancamano

Pr François Meurens

Pre Fanny Renois

Pre Marie-Hélène Deschamps (U Laval)

Toute l'équipe



Groupe de recherche sur  
les maladies infectieuses  
en production animale



Université   
de Montréal

Centre de Recherche en  
Infectiologie Porcine et Avicole  
Swine and Poultry Infectious  
Diseases Research Center



Université   
de Montréal

*Agriculture, Pêcheries  
et Alimentation*

Québec 



**NSERC  
CRSNG**