



Biodiversité, gènes & communautés

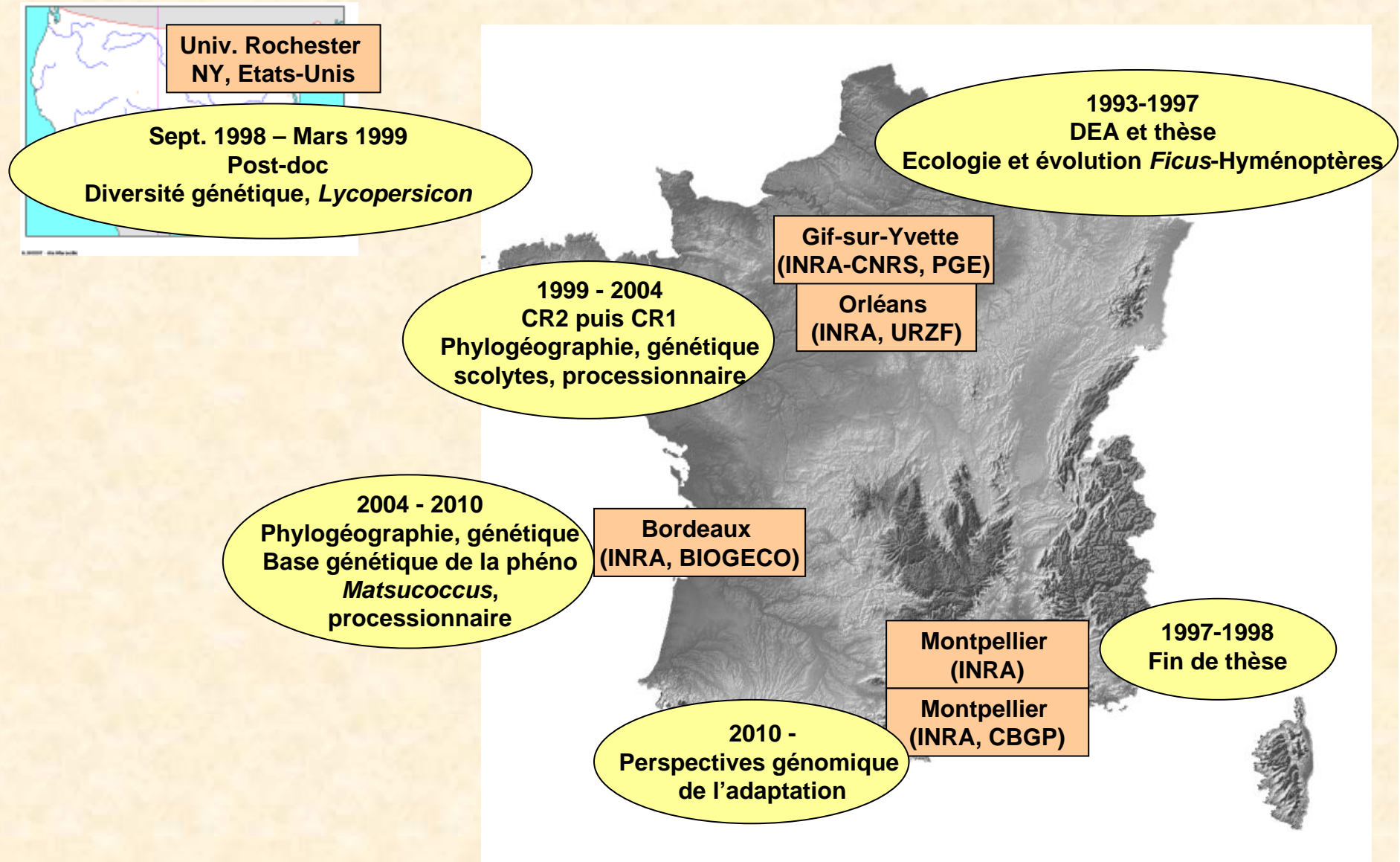


# **Génétique évolutive en entomologie forestière : bilan 1999-2009 et perspectives**

**Habilitation à Diriger des Recherches  
Carole Kerdelhué**

**Jury :** Jean-François Silvain (rapporteur)  
Jean-Christophe Simon (rapporteur)  
Pierre Taberlet (rapporteur)  
Richard Michalet (examineur)  
Rémy Petit (examineur)

# Parcours professionnel



# 1999 : recrutement à l'INRA d'Orléans

**Objectifs : développer les approches de biologie évolutive en entomologie forestière**

**Modèles biologiques principaux (études écologiques) :**

- **Scolytes, coll. G. Roux, F. Lieutier**



- ***Megastigmus* (séminiphages), coll. M.-A. Auger-Rozenberg, A. Roques**



- **Processionnaires, coll. J. Rousselet, A. Roques**



# Objectifs généraux et outils

## Questions abordées sur les différents modèles biologiques :

- Systématique moléculaire et délimitation d'espèces
- Structuration intra-spécifique, délimitation des populations
- Identification des facteurs structurants : barrières géographiques, spécificité d'hôtes, phénologie, capacités de dispersion...

## Disciplines :

- Phylogénie et phylogéographie
- Génétique des populations

## Outils développés :

- Séquençage de fragments d'ADN polymorphes / conservés
- Marqueurs microsatellites (mises au point spécifiques)



# Première partie :

## Délimitation d'espèces et étude comparée de patrons phylogéographiques

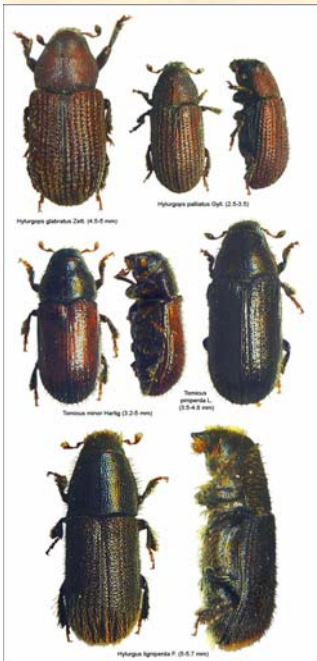


Illustration :

Les Scolytes du genre *Tomicus*,  
en particulier *T. piniperda* et *T. destruens*



## Les scolytes du genre *Tomicus* (en 1999...)

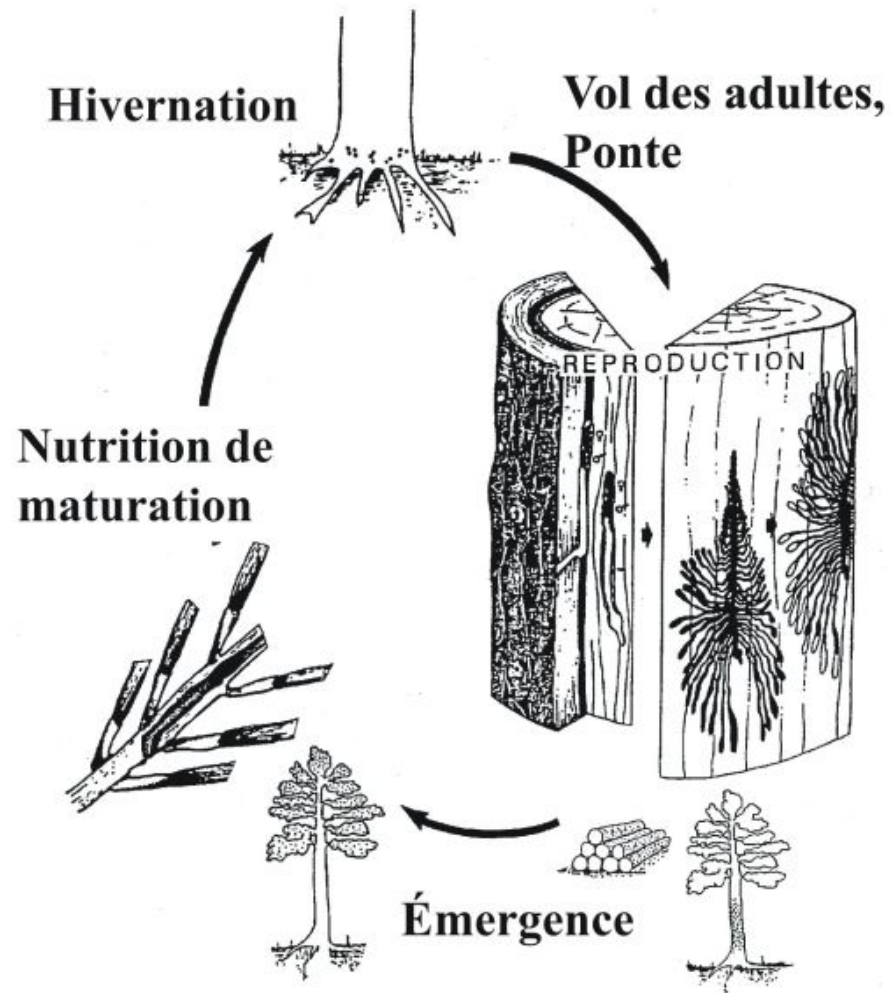
Scolytes : coléoptères se développant sous l'écorce des arbres. Les larves se nourrissent de phloème et laissent des traces de galeries caractéristiques.

- Petit genre de scolytes (5 espèces dans le monde), inféodés aux pins
- 3 espèces asiatiques :  
*T. brevipilosus*, *T. puellus* et *T. pilifer*
- 2 espèces à répartition paléarctique :  
*T. piniperda* (dont écotype méditerranéen *destruens*) et *T. minor*

## Cycle biologique de *Tomicus piniperda*



Attaque sur pousse, en été



Attaque sur tronc, fin d'hiver



## Objectifs des recherches menées sur *Tomicus*

- **Eclaircir le statut taxonomique de *T. piniperda* :**

Ecotype méditerranéen *T. p. destruens*?

Différenciation des populations asiatiques

(dégâts importants au Yunnan sur *Pinus yunnanensis*, comportements particuliers)

**Thèse Y. Duan**

- **Déterminer s'il existe une structuration des populations :**

Différenciation par hôte, ou espèce polyphage?

Quelles barrières à la dispersion?

- **Préciser les distributions géographiques des espèces, sous-espèces, écotypes... et les facteurs les structurant**

**Thèse T. Vasconcelos**

**Thèse A. Horn**



## Statut de *T. piniperda* : approche phylogénétique

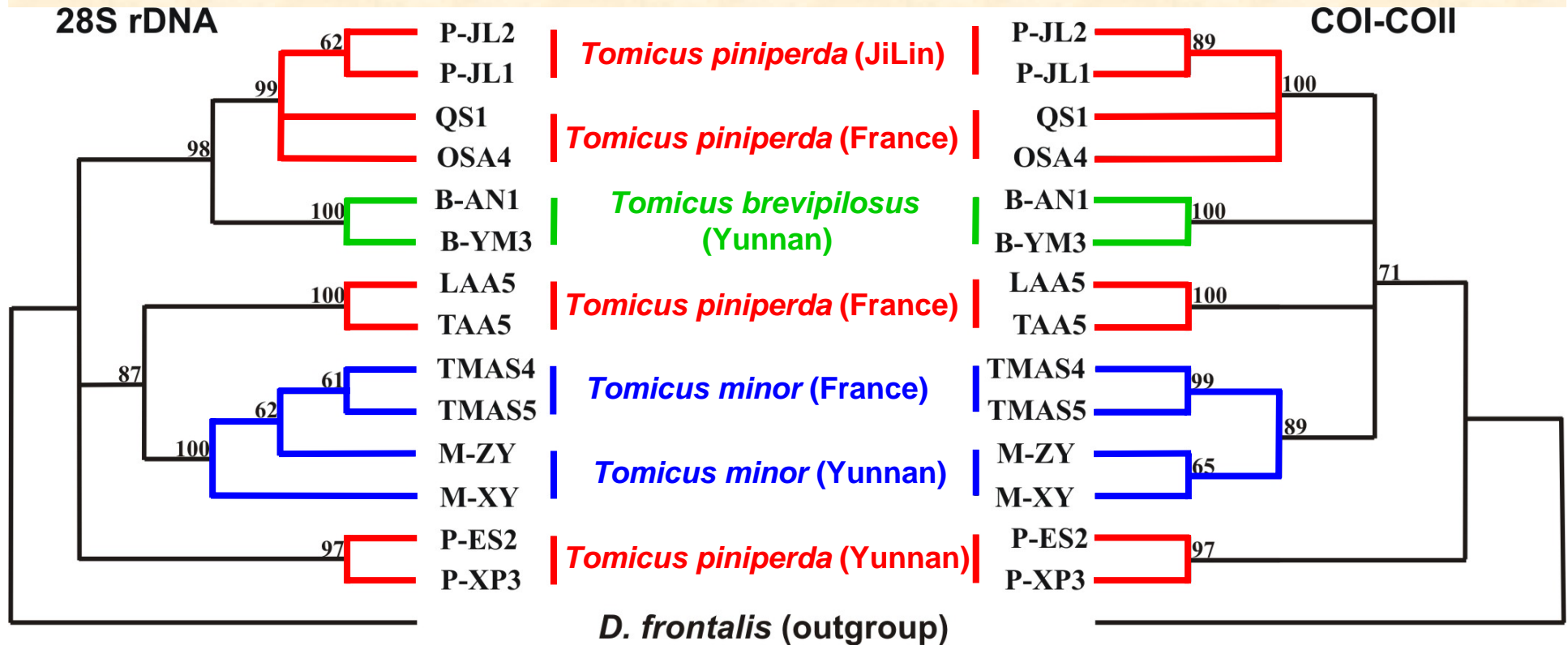
- Echantillonnage sur arbres-pièges en France, au Portugal, et dans deux Provinces de Chine (automne et printemps)

→ récoltes *T. piniperda* et *T. minor*

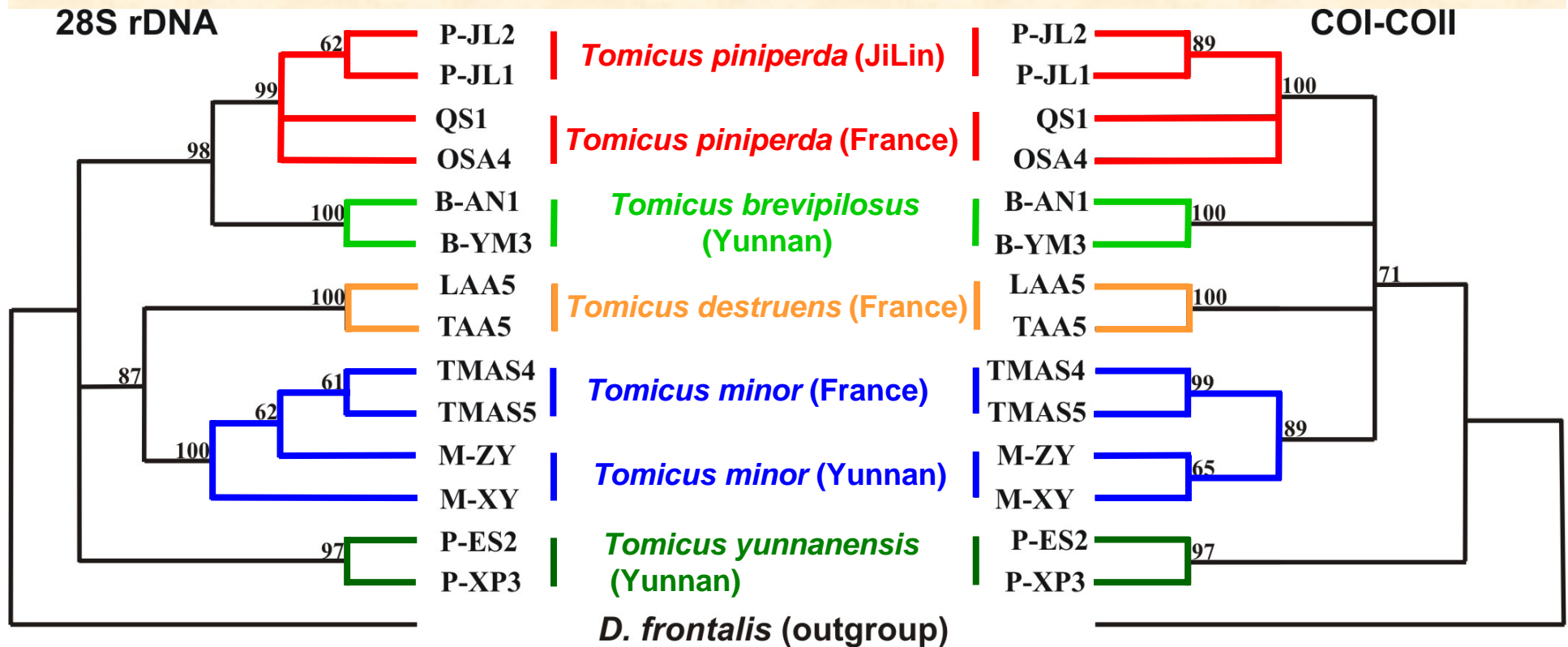
- Séquençage d'une partie des gènes mitochondriaux COI-COII, et des domaines nucléaires ITS2 et 28S rDNA

- Analyse phylogénétique et comparaison des distances génétiques

# Statut de *T. piniperda* : approche phylogénétique



# Statut de *T. piniperda* : approche phylogénétique



- Kerdelhué, C., Roux-Morabito, G., Forichon, J., Chambon, J.-M., Robert, A. & Lieutier, F. 2002. *Mol. Ecol.* 11: 483-494.
- Duan, Y., Kerdelhué, C., Ye, H. & Lieutier, F. 2004. *Heredity* 93: 416-422.

## Statut de *T. piniperda* : conclusions

- Le genre *Tomicus* compte désormais (au moins) 7 espèces mondiales
- *T. piniperda sensu stricto* est présente en France et en Chine (JiLin)  
non trouvée au Yunnan (*quid* des travaux sur l'écologie de *T. piniperda*?)
- *T. brevipilosus* a été trouvé pour la première fois au Yunnan  
probablement confondu avec *T. piniperda* dans des travaux précédents...
- *T. yunnanensis* est responsable des dégâts sur *Pinus yunnanensis*  
avec un comportement d'agrégation des adultes inconnu chez les autres espèces
- *T. destruens* est une espèce à part, probablement méditerranéenne  
caractériser les distributions géographiques et spectres d'hôtes des deux espèces



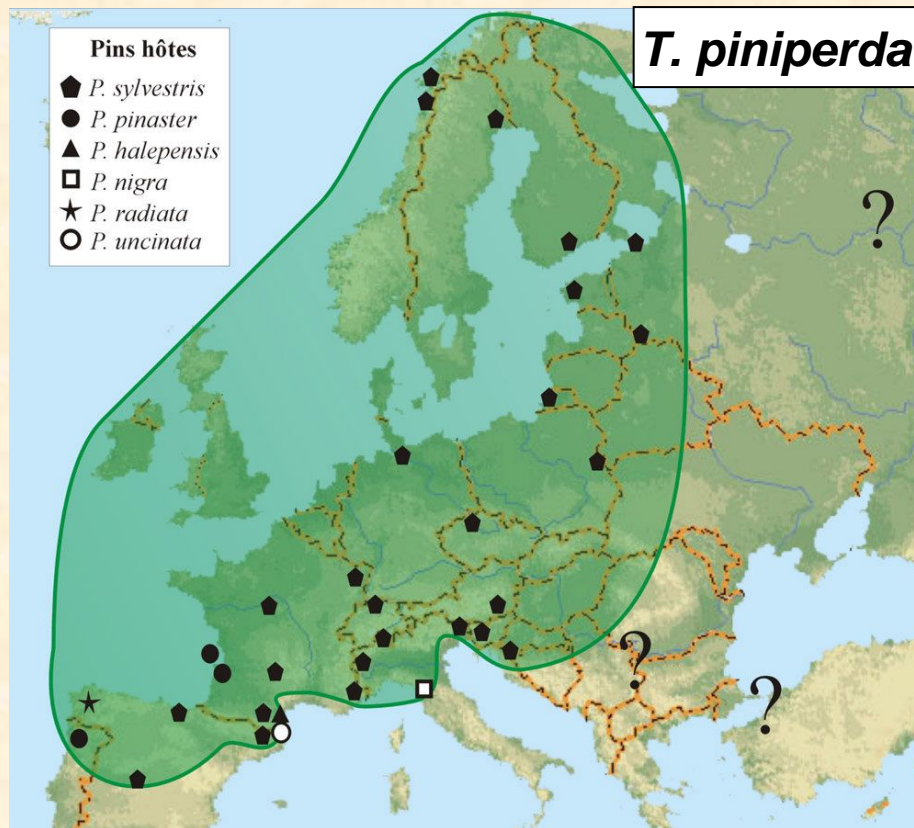
# Distributions et histoires évolutives de *T. piniperda* et *T. destruens*

**Thèse  
Agnès Horn**

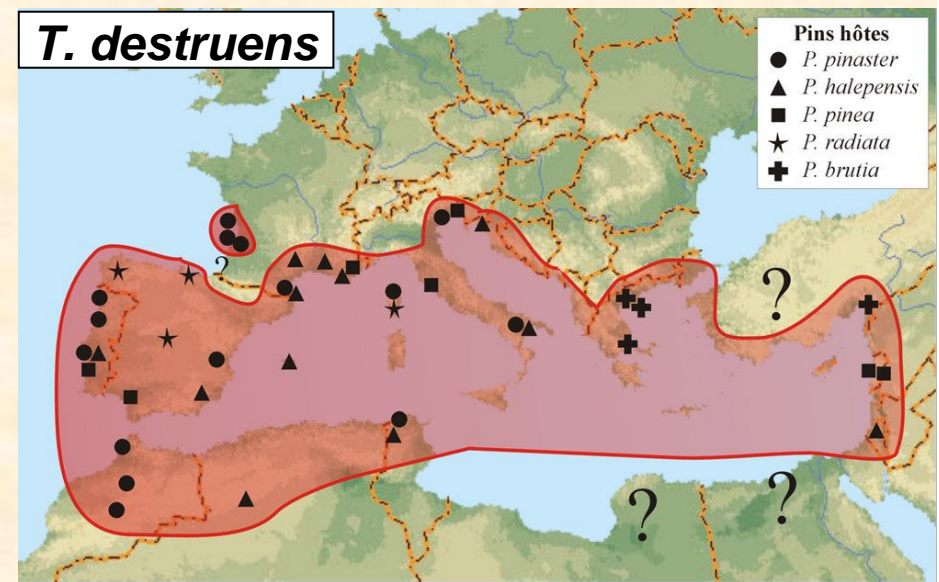


- Echantillonnage systématique sur l'ensemble de leurs aires potentielles (arbres-pièges), au printemps et à l'automne (deux périodes de reproduction)
- Identification morphologique et moléculaire (COI-COII) des adultes
- Analyse comparée des aires de distribution (climat, arbres-hôtes)
- Analyse fine des données moléculaires pour comprendre l'histoire évolutive récente (phylogéographie, impact des glaciations, zones refuges...)

## Résultats : distributions *T. piniperda* et *T. destruens*



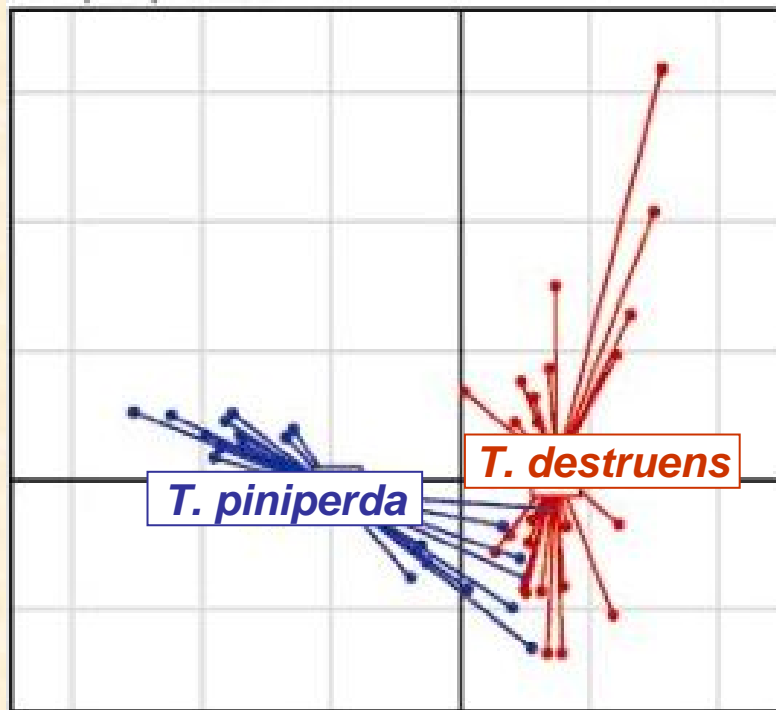
Hautes latitudes et altitudes  
Absent en zone méditerranéenne  
Hôtes principaux :  
*P. sylvestris* et *P. pinaster*



Distribution circum-méditerranéenne  
Absent en altitude  
Hôtes principaux :  
pins méditerranéens

## Résultats : distributions *T. piniperda* et *T. destruens*

- Analyse multivariée (ACM) sur données décrivant les sites d'échantillonnage (présence/absence des différents pins hôtes, données météo)



### *T. piniperda* :

$T_{max} < 15^{\circ}\text{C}$ ,  $T_{moy} < 10^{\circ}\text{C}$  et  $T_{min} < 5^{\circ}\text{C}$   
Présence de *P. sylvestris*

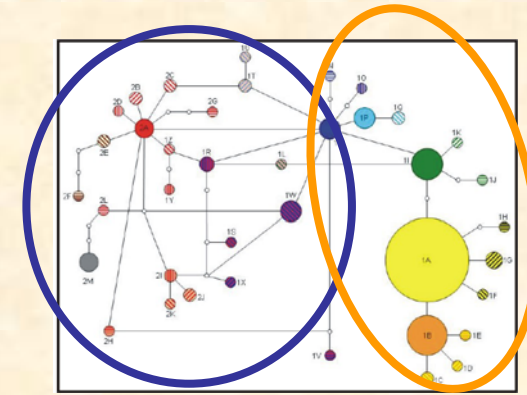
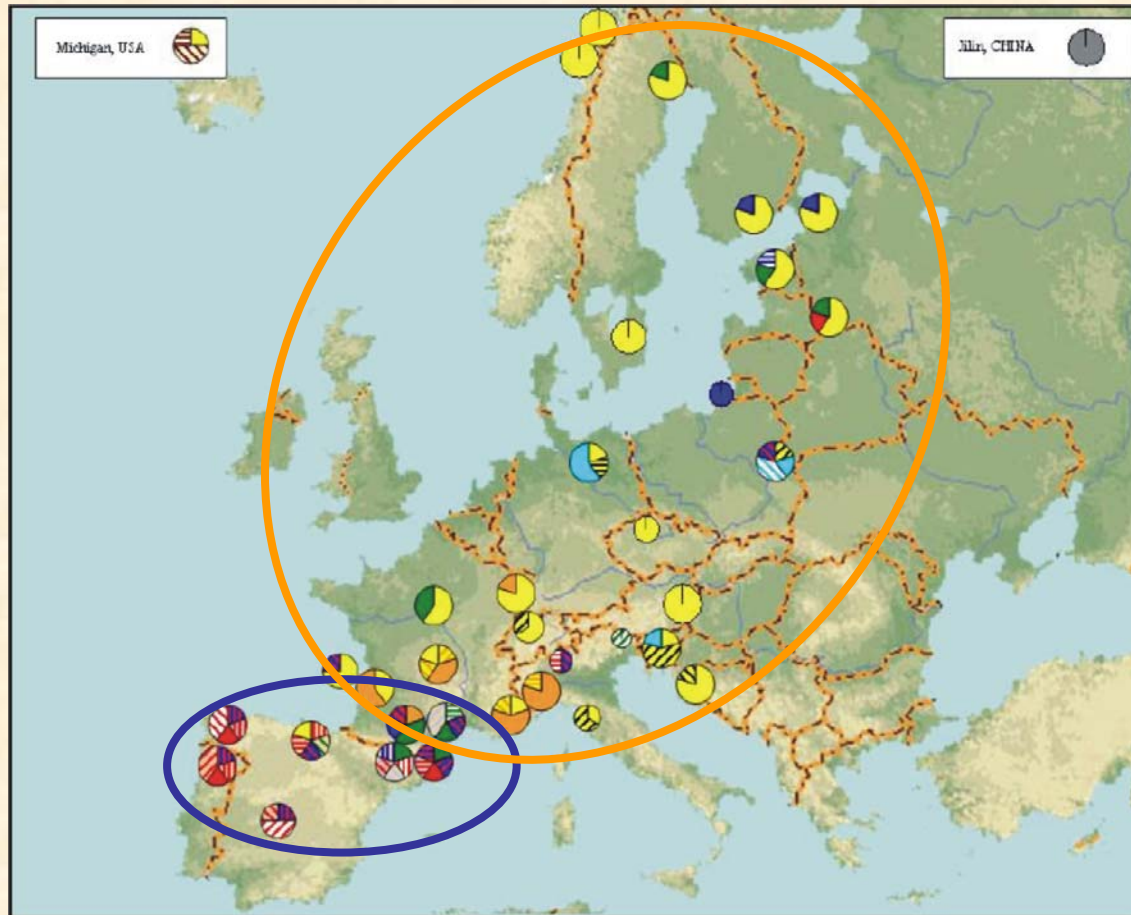
### *T. destruens* :

$T_{max} > 15^{\circ}\text{C}$ ,  $T_{moy} > 10^{\circ}\text{C}$  et  $T_{min} > 5^{\circ}\text{C}$   
Absence de *P. sylvestris*

Pas de différences pour les précipitations  
Résultats cohérents avec données d'élevage



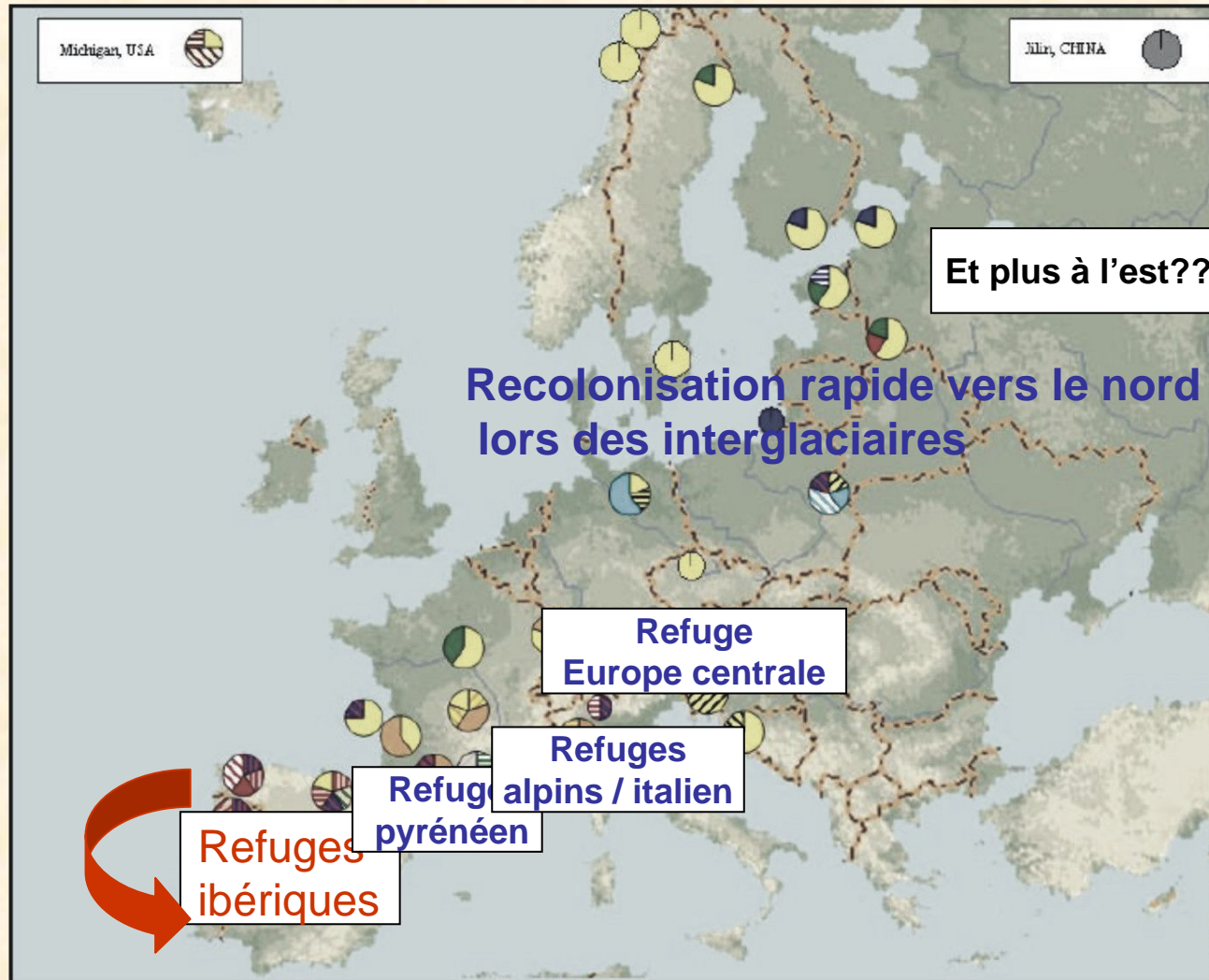
# Phylogéographie de *T. piniperda*



Péninsule ibérique + Pyrénées  
Reste de l'Europe



## Phylogéographie de *T. piniperda*



Maintien *in situ* des populations  
Peu de dispersion hors péninsule ibérique

## Phylogéographie de *T. piniperda*

### Structure phylogéographique assez classique pour espèce tempérée :

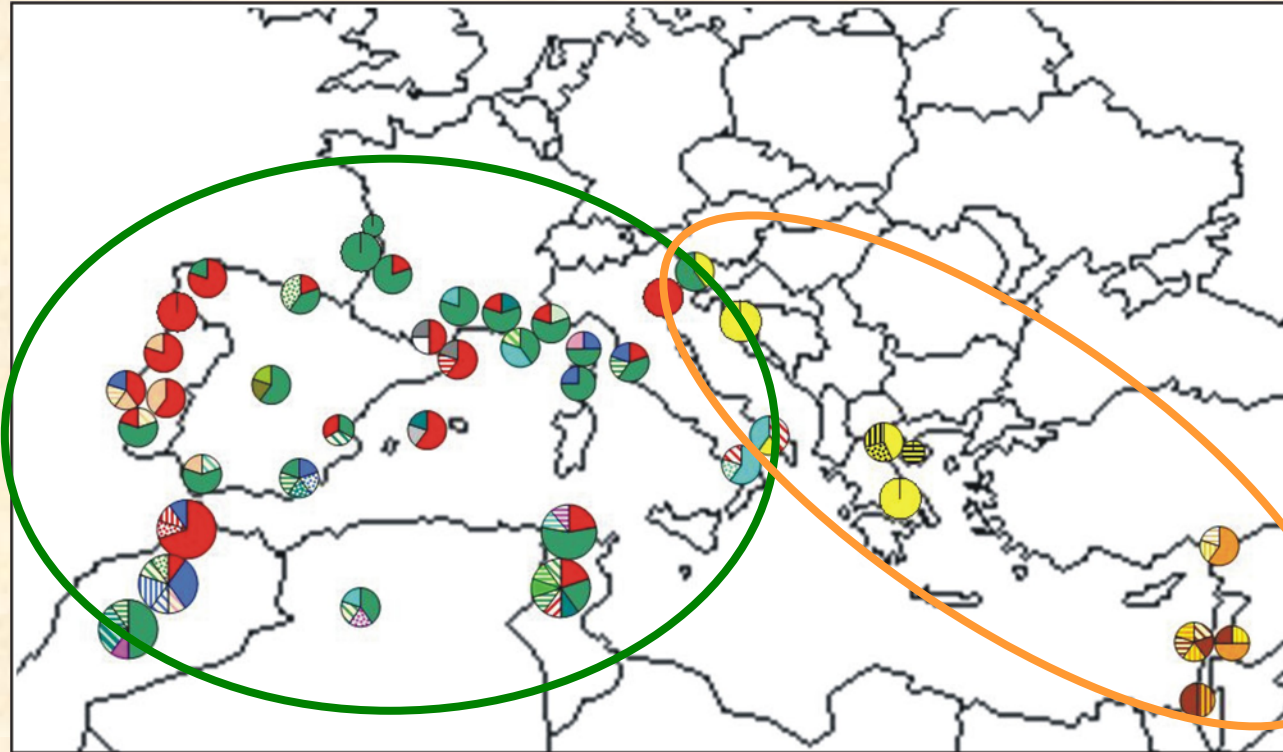
Sensibilité à la chaleur et tolérance au froid : refuges en moyenne latitude, proche de zones montagneuses ; possibles extinctions lors des interglaciaires

Espèce associée au pin sylvestre : nombreux refuges partagés

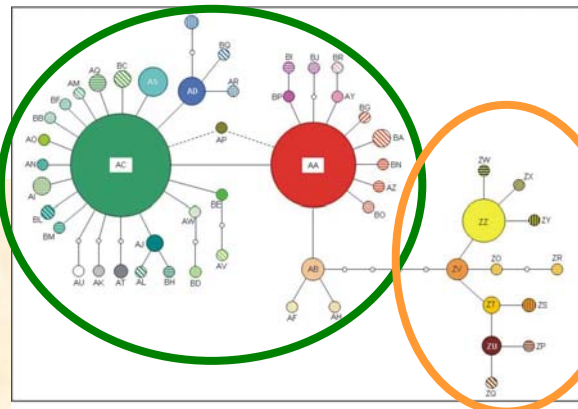
Bonne capacité de dispersion : diversité génétique peu structurée dans l'espace (surtout hors péninsule Ibérique), événements fréquents de dispersion longue distance; recolonisation rapide, issue de plusieurs refuges, lors des interglaciaires

Survie *in situ* en péninsule ibérique pendant les cycles Quaternaires : existence de nombreux petits refuges, survie grâce à mouvements limités

## Phylogéographie de *T. destruens*

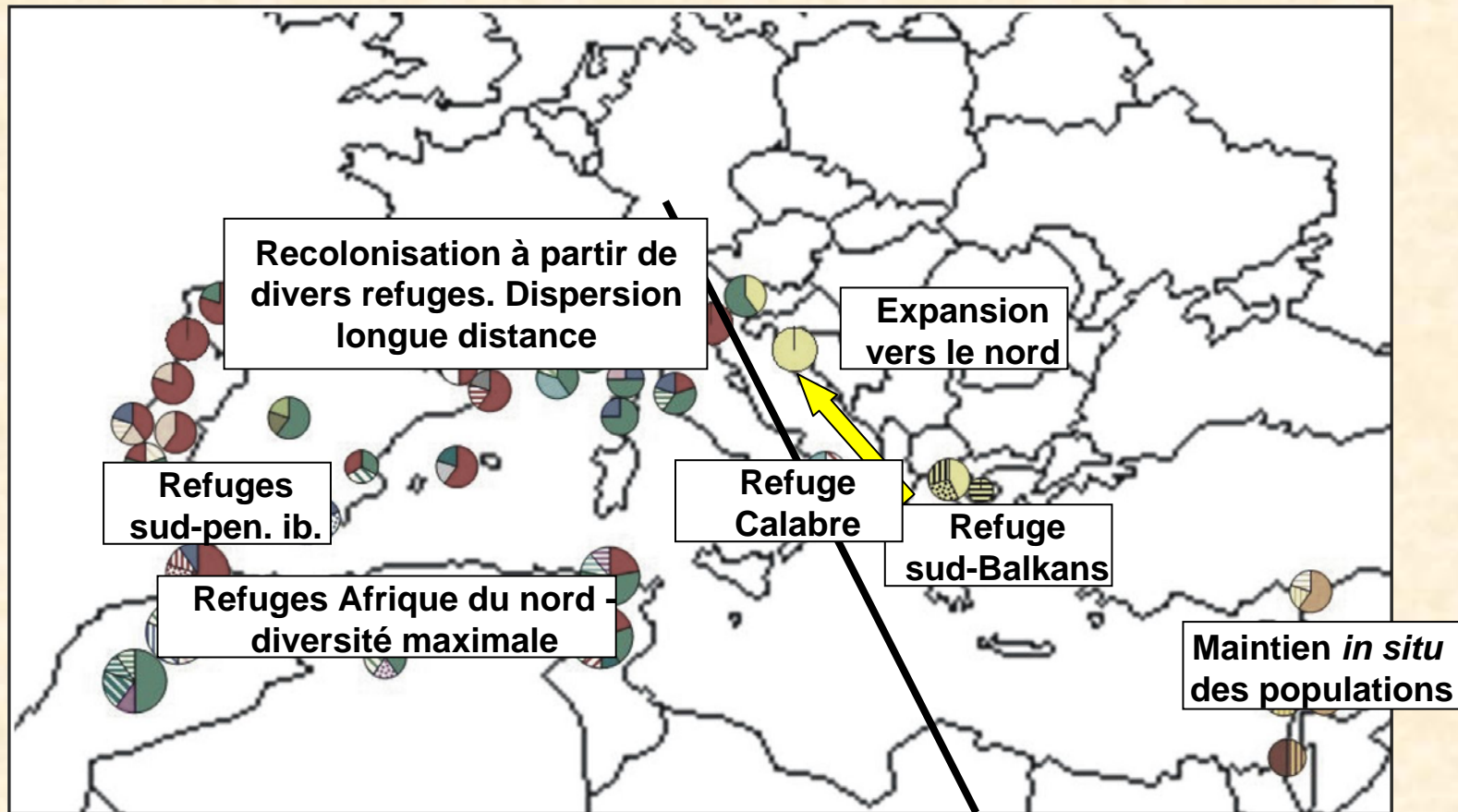


Un groupe occidental :  
diversité max. Maghreb,  
sud Espagne, sud Italie



Un groupe oriental :  
diversité max. Moyen Orient,  
sud Balkans

## Phylogéographie de *T. destruens*



Existence d'une zone de contact entre clade occidental et clade oriental dans l'est de l'Italie (nord et sud)



## Phylogéographie de *T. destruens*

### Structure phylogéographique liée aux caractéristiques écologiques de cette espèce méditerranéenne :

Sensibilité au froid et tolérance à la chaleur :

refuges situés très au sud, jusqu'en Afrique du Nord et au Moyen-Orient  
maintien local d'une grande diversité haplotypique

Différenciation récente d'un clade oriental et d'un clade occidental :

rôle potentiel de la fragmentation des hôtes en limite sud

Plus d'événements de dispersion longue distance à l'ouest qu'à l'est :

potentiellement liés à la plus grande intensité des oscillations Quaternaires

## Intérêts de ce type d'approches

### **Délimiter les taxons pour mieux les caractériser :**

Définir les spectres d'hôtes chez les insectes phytophages (une espèce généraliste ou plusieurs lignées spécialistes?)

Définir les caractéristiques écologiques (finalité de lutte ou de conservation), les assemblages d'espèces

Connaître les aires de répartition, les zones de sympatrie ...

### **Connaître les structures intra-spécifiques :**

Analyser les barrières aux flux de gènes, les capacités de dispersion

Connaître les échelles auxquelles se structurent les populations

Etudier l'adaptation (ou mal-adaptation) locale

### **Connaître les patrons de diversité neutre, pour interpréter les données issues de marqueurs soumis à sélection :**

Recherche marqueurs impliqués dans des traits adaptatifs

## Des approches similaires sur d'autres modèles

### **Phylogéographie (aire naturelle), phylogénie, espèces cryptiques :**

Le complexe des processionnaires du pin (Collab. INRA Orléans, Univ. Padoue, Univ. Ankara)

Les séminiphages du genre *Megastigmus* (Collab. INRA Orléans)

### **Phylogéographie comparée sur plusieurs niveaux trophiques :**

Les parasitoïdes des œufs de processionnaire (Collab. INRA Orléans) – travail débuté en janvier 2010

### **Structuration des populations et scénarios de colonisation :**

La cochenille spécialiste du pin maritime *Matsucoccus feytaudi* (Biogeco)

La mouche des fruits *Bactrocera dorsalis* (Collab. Univ. Yunnan)

La cicadelle de la vigne *Scaphoideus titanus* (Collab. ENITAB/INRA Bdx)

Le *Megastigmus* du Cèdre *M. schimitscheki* (Collab. INRA Orléans)

## Deuxième partie :

# Différenciation allochronique chez la processionnaire du pin





# Le modèle biologique : la processionnaire du pin

**Lépidoptère Notodontidae**



**Chenilles urticantes, à développement hivernal dans des nids caractéristiques**

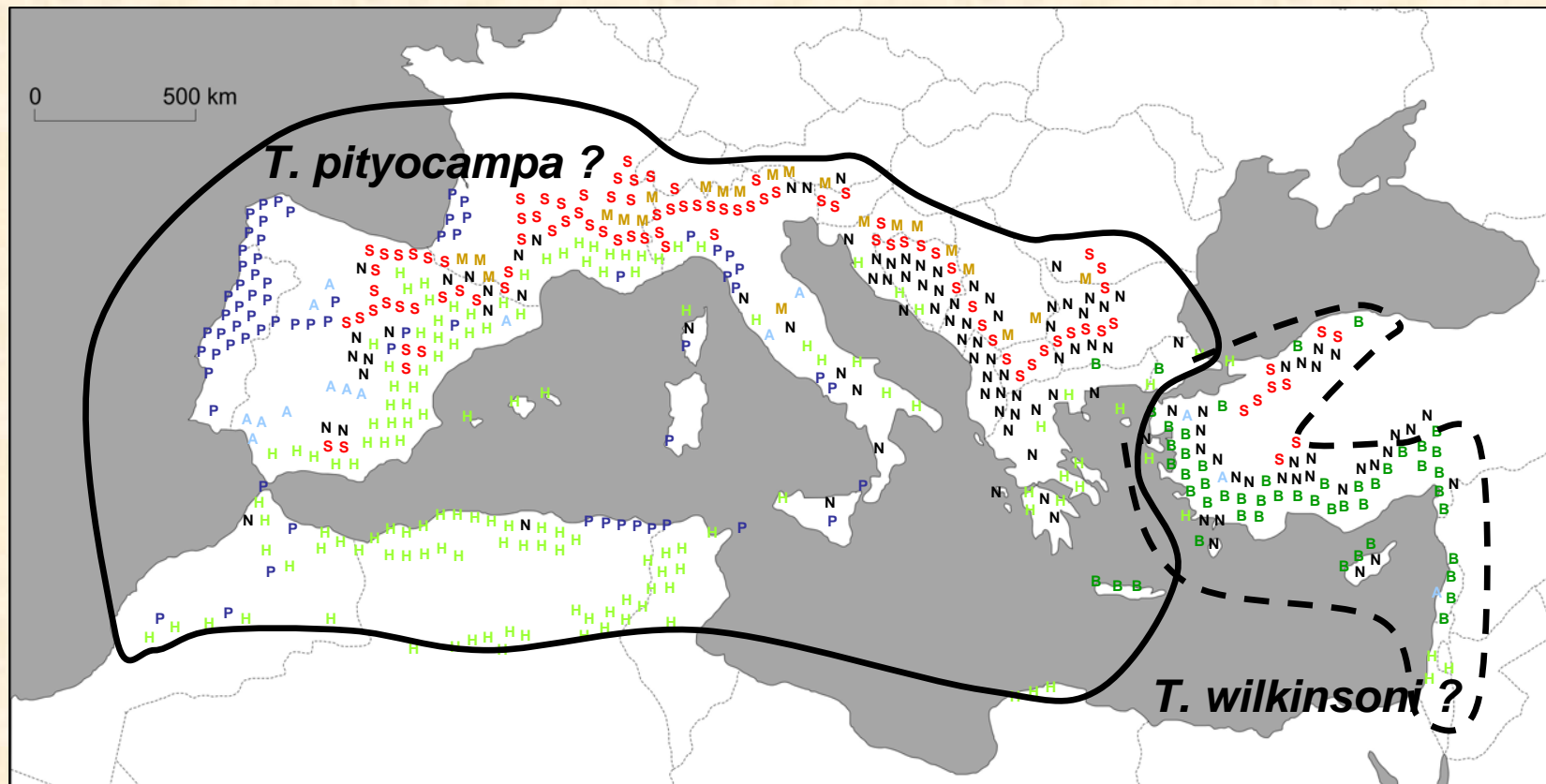


**Processions de fin d'hiver, et nymphose dans le sol**



## Distribution et structuration génétique

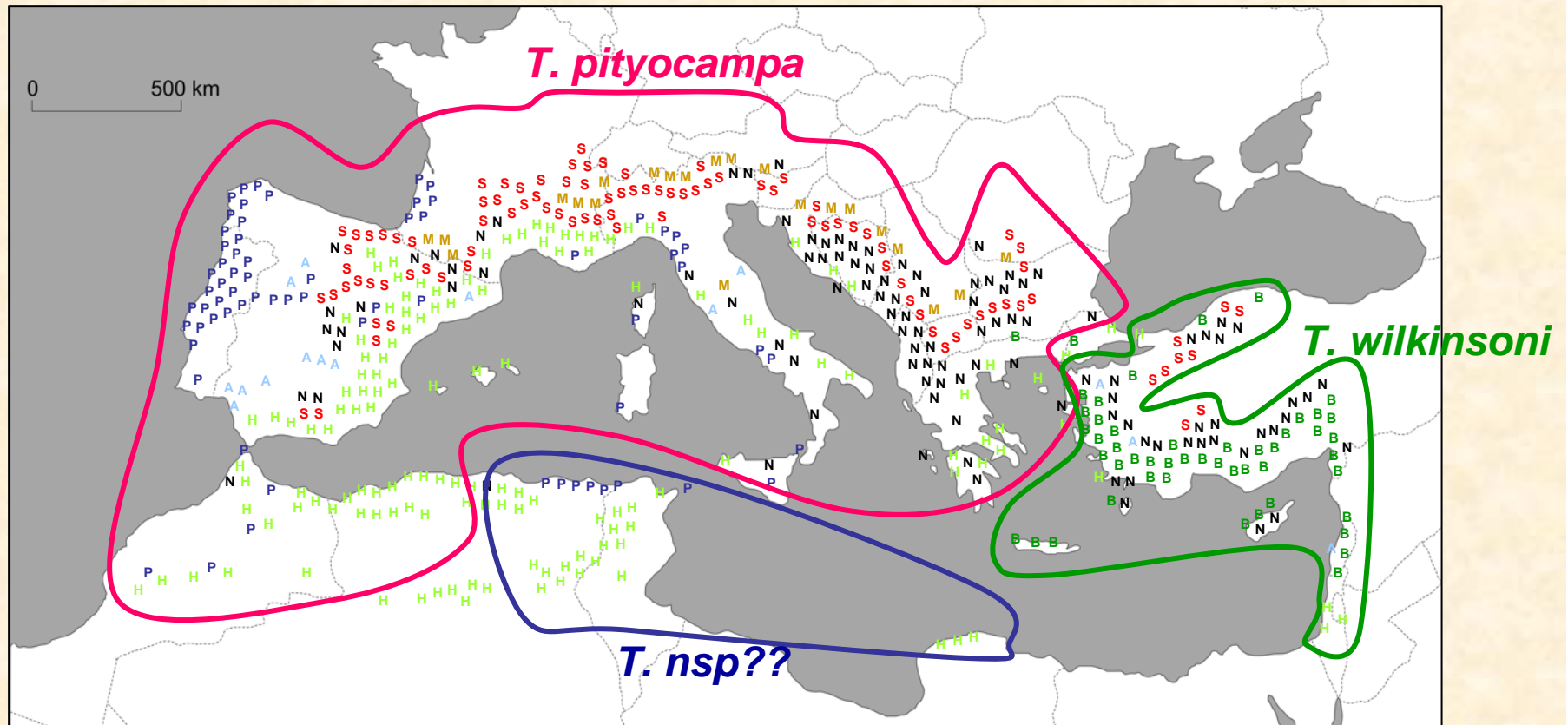
Un complexe d'espèces circum-méditerranéen  
associé à la plupart des espèces de pins :  
*Thaumetopoea pityocampa* et *T. wilkinsoni*?



Collaborations: INRA Orléans (J. Rousselet, A. Roques), Univ. Padoue (A. Battisti)  
+ nombreux contacts pour échantillonnage

## Distribution et structuration génétique

Un complexe d'espèces circum-méditerranéen associé à la plupart des espèces de pins :  
*T. pityocampa*, *T. wilkinsoni* et *T. nsp?*





# Cycle de développement

**Pupation  
(dans le sol)**



**Emergence des adultes  
Reproduction (ponte)**



**Dévelop. larvaire  
en hiver**





## Une processionnaire d'été au Portugal?

Découverte en août 1997 à Leiria (Portugal) d'une population aberrante :  
(M.R. Paiva, M. Branco, Univ. Lisbonne)



- Développement larvaire en été
- Processions en septembre (au lieu de février)
- Maintien en sympatrie d'une population à développement larvaire hivernal « habituel »

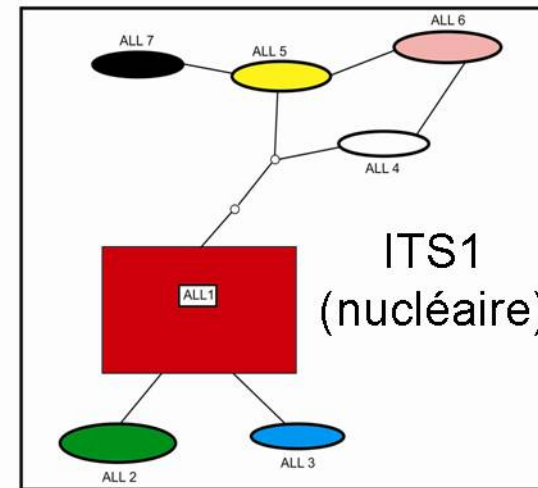
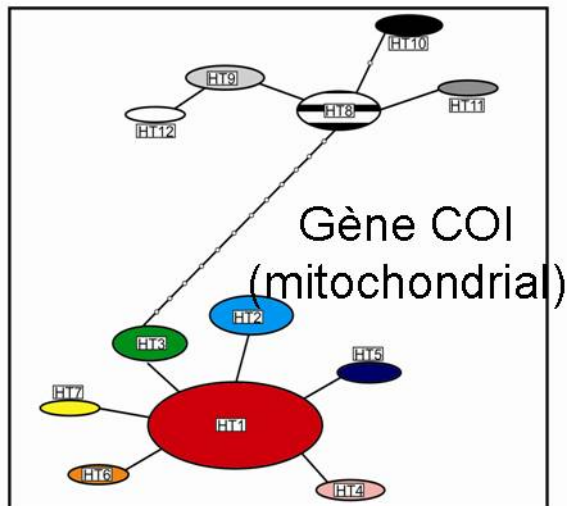
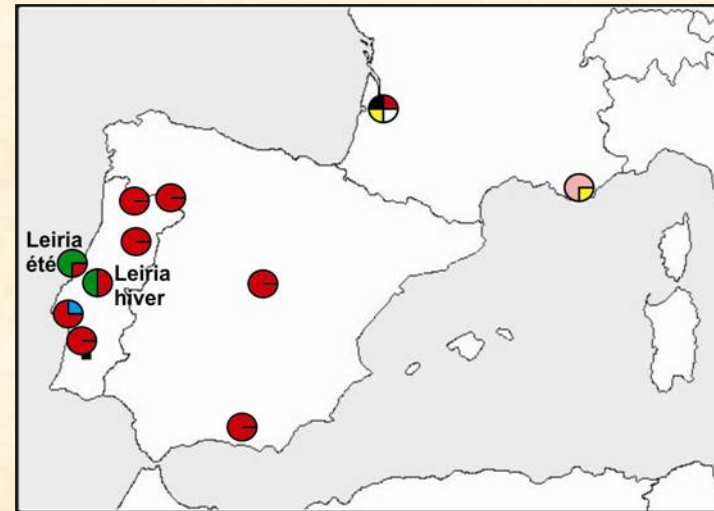
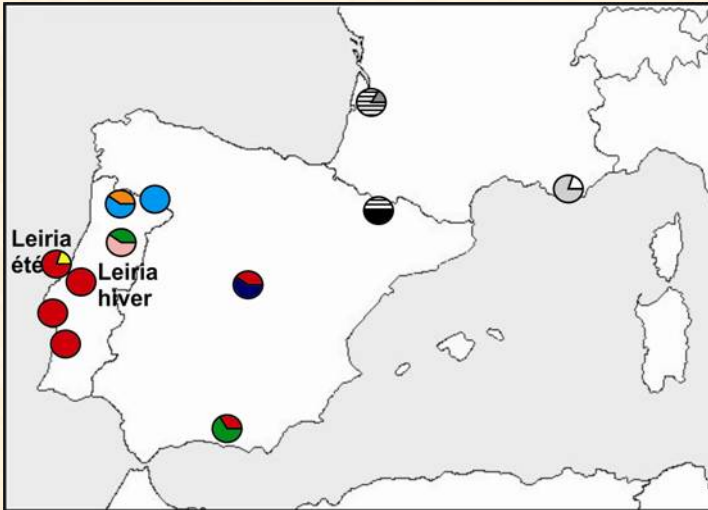
Espèce cryptique à développement décalé?

« Mutation » phénologique?

Flux de gènes potentiels avec la population à cycle normal?



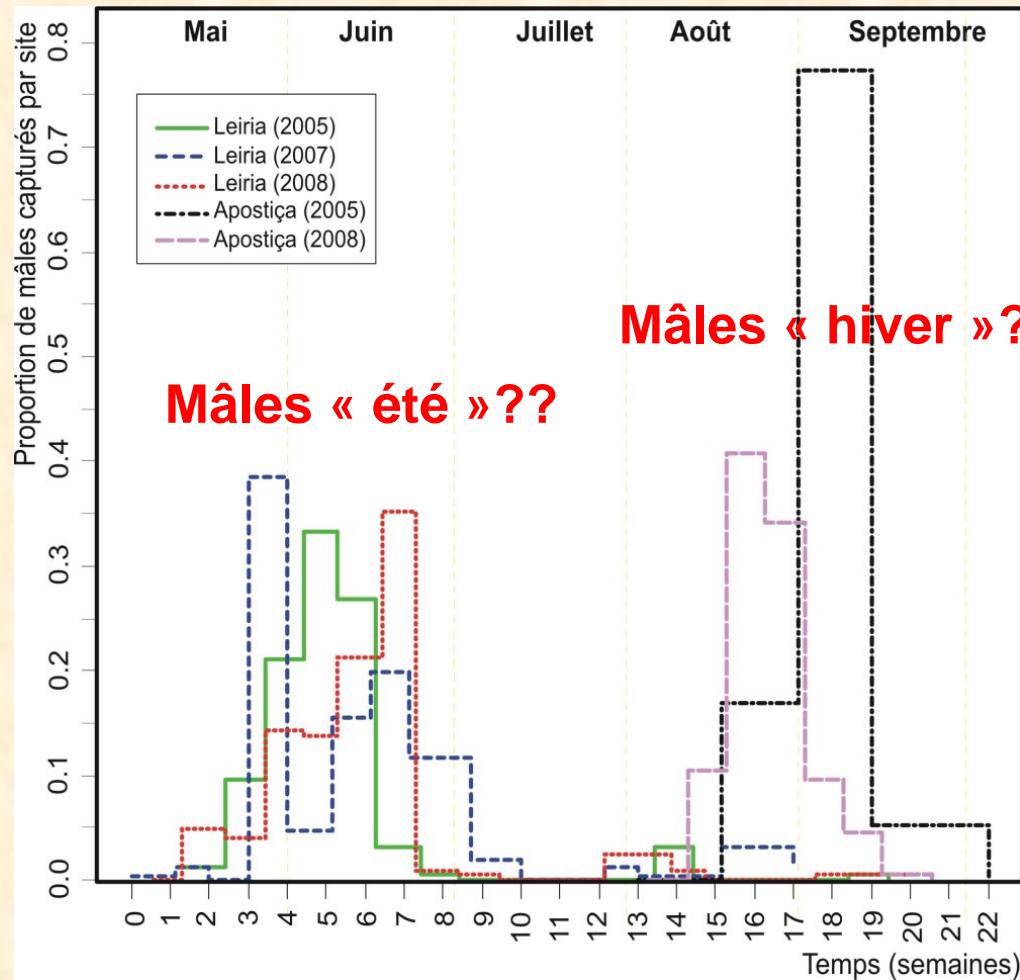
# La « population d'été » : une population particulière de *T. pityocampa*



Il ne s'agit pas d'une espèce cryptique...

## La « population d'été » : une phénologie décalée unique

Suivi de l'émergence  
des adultes par  
piègeage phéromonal



Les dates d'activité des adultes (et donc de reproduction) ne sont pas chevauchantes → flux de gènes limités entre les deux populations?

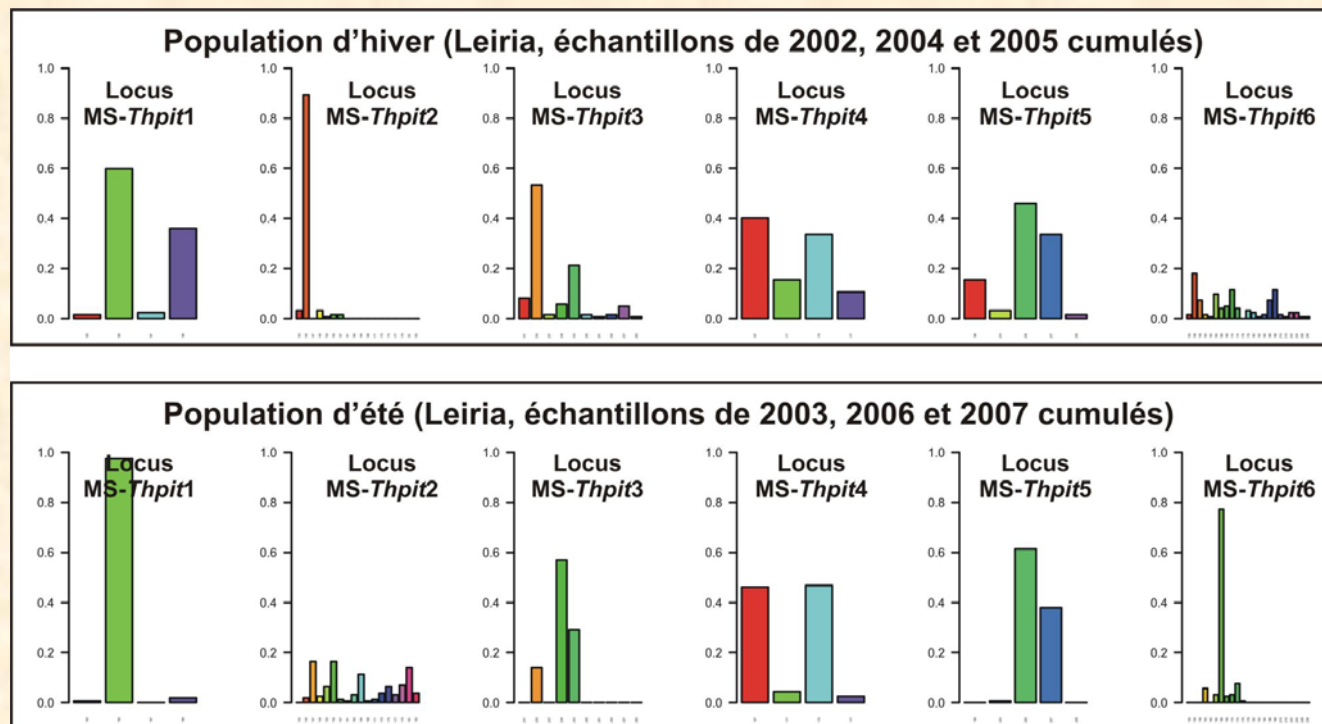
# La « population d'été » : structuration génétique, différenciation

Thèse  
Helena Santos



Analyse avec 6 loci microsatellites de larves prélevées 3 années différentes dans la population d'hiver et dans la population d'été :

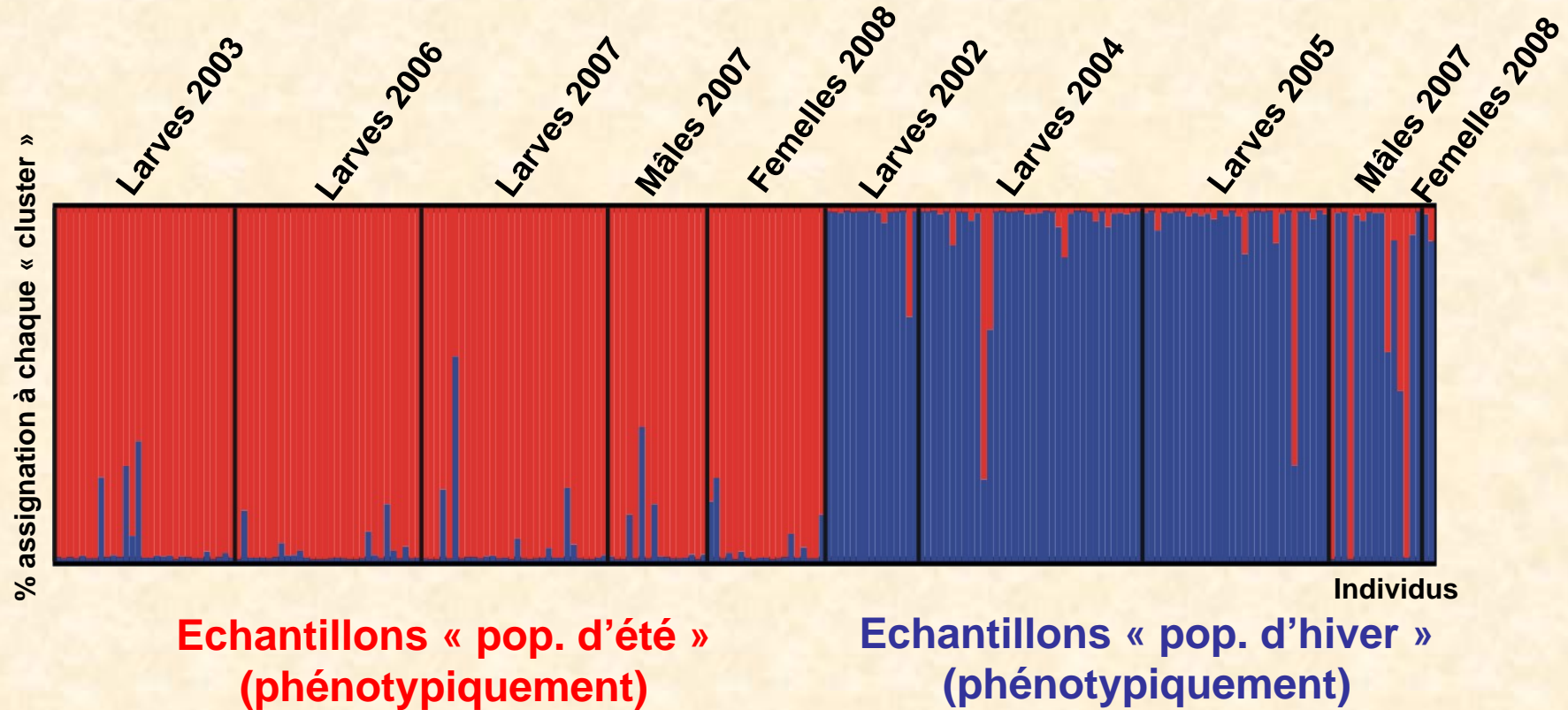
- Forte différenciation génétique entre les deux populations ( $F_{st} \sim 0,19$  à  $0,27$ )
- Effet fondateur probable (?)





## La « population d'été » : structuration génétique, assignation

Analyse Bayésienne (logiciel Structure) des larves et des adultes, en supposant 2 populations :



## La « population d'été » : première étape d'une spéciation sympatrique?

- Cette population est d'origine récente (évolutivement parlant...)
- Hypothèse probable = fondation *in situ* à partir de quelques individus du pool local de processionnaire (suite à une modification du cycle)  
A confirmer avec 13 nouveaux marqueurs microsatellites
- Il existe des flux de gènes très limités (*via* émergence d'adultes?) entre les deux populations (à confirmer)  
Phénologie des hybrides? Fitness? Quelles conséquences sur l'évolution des populations?
- Héritabilité de la phénologie? Bases génétiques?
- Divergence écologique entre individus d'été et d'hiver :  
Les deux pops diffèrent par leur capacité à survivre aux fortes températures (autres traits en cours d'analyse...)

## **Perspectives :**

# **Vers une approche génomique de l'adaptation : études des bases génétiques de la phénologie**

**Perspectives à court terme (Pierroton et CBGP)**

**(travail de I. Pivotto, M2, co-encadrée par Christian Burban) :**

**approche gènes-candidats**

**Perspectives à moyen terme (CBGP) :**

**analyse pan-génomique de la variabilité génétique  
architecture génétique de la phénologie chez la  
processionnaire du pin**

# Bases génétiques de la phénologie

## 1- Approche gènes candidats

### Principes :

1- choisir *a priori* des gènes potentiellement impliqués dans les cycles biologiques (bibliographie, banques de gènes)

2- amplifier et séquencer ces gènes chez des individus à phénologie contrastée (pops été et pop hiver de Leiria, mais aussi pops plaine vs. altitude)

3- rechercher des liens statistiques entre génotype et phénotype (génétique d'association)



# Bases génétiques de la phénologie

## 1- Approche gènes candidats

### Mise en œuvre :

#### 1- Choix des gènes

- Impliqués dans les horloges biologiques [*period, cryptochrome, timeless, cycle....*]
- Impliqués dans la régulation de la diapause et du développement [*diapause hormone, juvenile hormone, ecdysone....* et les récepteurs]

#### 2- Amplification et séquençage

- Echec des essais d'amplifications à partir d'amorces dégénérées
- Mises au point à partir de données transcriptomiques obtenues sur la processionnaire dans réseau d'excellence Evoltree (banques cDNA pop été et pop hiver de Leiria)

# Bases génétiques de la phénologie

## 1- Approche gènes candidats

**Master**  
**Isabelle Pivotto**



### Travail en cours :

#### **Séquençage systématique de certains gènes :**

*Photolyase*, *Timeless* (plusieurs fragments), *Period* → I. Pivotto (M2)

#### **Mise au point amplification et séquençage pour d'autres :**

à court terme, *cycle*, *double time*, *ecdysone*, récepteurs...

#### **Analyse bio-informatique des séquences du transcriptome :**

recherche *in silico* de sites discriminant pop. été et pop hiver.

# Bases génétiques de la phénologie

## 2- Scans génomiques, génotypage haut débit

### Principe :

Utiliser les nouvelles technologies de séquençage et génotypage haut débit, et mettre à profit les développements récents d'algorithmes de détection de la sélection pour comprendre l'architecture génétique de la phénologie (approche sans *a priori*)

### Mise en œuvre :

S'appuyer sur les compétences complémentaires de jeunes scientifiques du CBGP autour d'un projet de recherche commun

Réjane Streiff, CR1 → génomique des pops et biologie évolutive des insectes phytophages

Mathieu Gautier, CR1 → génomique et cartographie, analyse de données

Renaud Vitalis, CR1 → développements méthodologiques, détection de signatures de sélection, scans génomiques

+ un ingénieur en Bio-informatique, recruté prochainement

# Bases génétiques de la phénologie

## 2- Scans génomiques, génotypage haut débit

**Un projet organisé autour de 3 tâches complémentaires :**

### **Tâche 1 : développement d'outils génomiques**

Séquençage de transcriptome  
Séquençage d'une partie du génome } Recherche et validation de sites polymorphes (SNP)

### **Tâche 2 : phénotypage et génotypage**

Analyse du phénotype de populations naturelles (labo)  
Génotypage haut-débit de pops naturelles et de lignées (croisements)

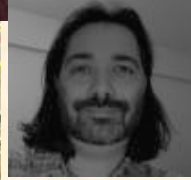
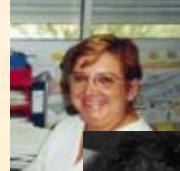
### **Tâche 3 : méthodologie et analyses des données**

Algorithmes d'analyses des données (quantifier la sélection, limiter les faux positifs...)  
Déterminer l'architecture génétique sous-tendant l'expression de la phénologie





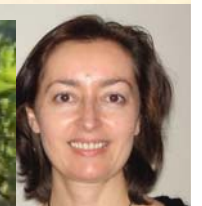
**GIF-SUR-YVETTE...**



**MONTPELLIER...**



**TOUS MES REMERCIEMENTS À ....**



**ORLÉANS...**



**BORDEAUX...**



**ET AILLEURS!**

