

**Interactions entre les lépidoptères mineurs de feuilles et leurs
endosymbiontes : une approche macroévolutive**



Projet dirigé par Carlos LOPEZ-VAAMONDE et David GIRON et encadré par Wilfried KAISER

Equipe zoologie forestière

Institut National de la Recherche Agronomique (INRA)

Centre d'Orléans

et

Equipe Ecologie Physique et Interactions Multitrophiques

Institut de Recherche sur la Biologie de l'Insecte (IRBI)

UMR CNRS 6035

Université François Rabelais Tours

Remerciement

Je remercie Alain Roques pour m'avoir permis de faire ce stage dans son équipe ainsi que Jean-Paul Monge pour m'avoir accueillie à l'IRBI.

Je remercie beaucoup Carlos Lopez et David Giron pour avoir dirigé mon stage, pour leurs conseils et leur aide.

Un très très grand merci à Wilfried Kaiser pour avoir encadré mon stage, pour son aide, sa disponibilité et aussi pour ses blagues et pour sa bonne humeur. Un grand merci également à Claudine Courtin pour son aide et à David Lees pour ses discussions, son analyse et ses commentaires sur les premières versions de ce rapport.

Je remercie également Karine Musset et Emmanuelle Magnoux.

Je remercie Marko Mutanen et Peter Huemer pour m'avoir donné accès aux données de leurs projets sur la base de données BOLD SYSTEMS ainsi que Claudia Baier (île Maurice), Hector A. Vargas (Chilie), Issei Ohshima (Japon), Ian Simms (Royaume-Uni), Povilas Ivinskis (Lituanie) pour m'avoir gentiment fourni des spécimens frais pour les analyses.

Merci à l'ensemble de l'équipe du projet Région Centre ENDOFEED, porté par David Giron, dans lequel s'inscrit ce stage.

Et merci à tous ceux qui m'ont aidé directement ou indirectement.

Table des matières

Remerciement	2
1. Introduction.....	4
2. Matériel et méthodes.....	6
2.1. Echantillonnage	6
2.2. Protocole	6
2.2.1. Mise au point du protocole d'extraction d'ADN	6
2.2.2. Choix des gènes d'intérêt	7
2.2.3. Protocole de PCR	9
2.2.4. Protocole de purification de PCR	10
2.2.5. Protocole de séquençage	10
2.3. Analyses.....	10
2.3.1. Analyse phylogénétique	10
2.3.2. Analyse de corrélation.....	11
3. Résultats	12
3.1. Expériences de mise au point du protocole d'extraction.....	12
3.2. PCR et séquençage	12
3.3. Barcode et identification	13
3.4. Reconstruction phylogénique	13
3.5. Reconstruction de l'histoire évolutive des caractères	13
3.6. Corrélation entre la présence d'îles vertes et la présence de <i>Wolbachia</i> :.....	14
4. Discussion	15
5. Conclusion et perspectives.....	20
References bibliographiques.....	22

1. Introduction

Un des challenges rencontrés par tout organisme vivant est l'acquisition de quantités suffisantes d'énergie et d'éléments nécessaire à la croissance et à la reproduction. De nombreux organismes sont confrontés à des sources d'énergies déséquilibrées en nutriments, pouvant induire de fortes contraintes sur leur développement et leur reproduction (Frost *et al.*, 2005). Par exemple, le contenu en nutriments d'une plante a des effets importants sur l'écologie, le comportement, la physiologie de l'herbivore qui la consomme (Kwang, 2007). Afin d'acquérir les nutriments nécessaires à leur croissance et leur reproduction, les herbivores ont développé différentes stratégies comme cela a pu être mis en évidence dans mon rapport bibliographique. Parmi ces stratégies, on observe en particulier chez certains consommateurs primaires, la capacité à manipuler les végétaux pour optimiser leurs qualités nutritives.

Les organismes manipulant les végétaux sont très nombreux, allant de l'homme, qui par différents procédés a su augmenter les valeurs nutritives de certains végétaux, aux bactéries formant des rhizobiums en manipulant certaines hormones végétales (Grunewald *et al.*, 2009). Parmi ces manipulateurs on trouve également les insectes galligènes, qui peuvent modifier la production et/ou la distribution des ressources nutritives à leur profit, mais aussi certaines espèces de mineuses de feuilles (Burstein *et al.*, 1994). Les mineurs de feuilles sont présents dans 4 ordres d'insectes : les coléoptères, les diptères, les hyménoptères et les lépidoptères. Ce sont tous des groupes d'insectes holométaboles ayant des stades larvaires morphologiquement distincts. Les adultes pondent sur les feuilles ou juste sous l'épiderme. Les larves, qui entrent dans la feuille après éclosion, se nourrissent alors des tissus internes durant une partie ou la totalité de leur vie larvaire (Sinclair et Hughes, 2010). Un des signes caractéristiques des manipulations induites par les insectes mineurs peut se manifester de façon très explicite à l'automne. En effet, lors de la sénescence de la feuille, la photosynthèse s'arrête et une partie des nutriments contenus dans le tissu foliaire est réallouée dans la plante (en particulier au niveau des racines). Pour la larve enclose dans la feuille, cette diminution de quantité de nutriment peut s'avérer délétère si son développement n'est pas achevé. Chez certaines espèces, la zone minée reste verte durant le jaunissement du reste de la feuille donnant naissance à un phénotype qualifié d'« île verte ». C'est le cas pour *Phyllonorycter blancardella* (Lepidoptera, Gracillariidae) un microlépidoptère minant les feuilles de pommier. Dans l'îlot vert, la concentration de cytokinines s'est avérée bien plus élevée que dans le reste de la feuille et parfois plus élevée que dans les feuilles vertes non minées (Giron *et al.*, 2007). L'origine de cette forte concentration d'hormone n'est pas encore connue, mais un médiateur bactérien semble jouer un rôle prépondérant dans l'induction du phénomène d'île verte (Kaiser *et al.*, 2010) chez *Phyllonorycter*

blancardella. Dans la population d'étude (Saché, France), la bactérie *Wolbachia*, apparaît comme un candidat privilégié dans ce phénotype étendu d'île verte. En effet, *Wolbachia* est la seule bactérie qui a été détecté à partir des mineuses de cette espèce. De plus, si l'on traite les mineuses avec des antibiotiques, les larves asymbiotiques ne forment pas d'îles vertes et le taux d'émergence des adultes chute drastiquement (Kaiser et al. 2010).

L'induction d'une île verte procure certains avantages aux larves de *Phyllonorycter blancardella*. En effet, elle leur permet de continuer à se développer sur la feuille jaunissante dans un microenvironnement favorable d'un point de vue énergétique jusqu'à atteindre le stade adulte (D. Giron communication personnelle ; Giron *et al.*, 2007). De plus, cela permet alors d'effectuer une génération supplémentaire par an. Néanmoins, l'association étroite entre l'insecte et une bactérie symbiotique peut également avoir un coût lors d'association avec des bactéries de type parasite comme cela est généralement le cas avec *Wolbachia* (Frost *et al.*, 2010). Si l'île verte est bien associée à la présence de *Wolbachia*, on peut s'interroger sur la balance bénéfique/coût et les implications dans l'évolution et la diversification des mineuses.

D'autre part, les études citées ci-dessus portaient sur une seule espèce de mineuses, *Phyllonorycter blancardella*. Afin de savoir si le rôle de *Wolbachia* dans la formation d'îles vertes est envisageable chez d'autres espèces de mineuses, Il est intéressant d'étudier la distribution de *Wolbachia* et la corrélation avec la présence d'îles vertes chez d'autres espèces mineuses et en particulier au sein de cette famille des Gracillariidae. En effet, c'est l'une des plus grandes familles de lépidoptères avec presque deux milles espèces (DePrins et DePrins, 2011). La plupart des larves de Gracillariidae forment des mines tentiformes ou en serpentines dans les feuilles. Plusieurs d'entre elles sont des espèces invasives importantes (Valade *et al.*, 2009 ; Lopez Vaamonde *et al.*, 2010). Cependant certaines espèces montrent également d'autres stratégies comme les mineuses de fruits, les foreuses de tige, les galligènes... (Davis et Robinson, 1998 ; DePrins et DePrins, 2005).

Les objectifs de ce projet sont:

1. Développer un protocole permettant de détecter *Wolbachia* à partir de quantités très faibles de tissus comme les premiers stades larvaires de microlépidoptères permettant ainsi une analyse sur un plus grand nombre d'échantillons.
2. De tester la validité du « DNA barcoding » comme outil pour identifier au niveau de l'espèce différents stades de Gracillariidae.

3. D'évaluer l'étendue de l'association *Wolbachia*/mineuses de feuilles/île verte, en investiguant la présence de *Wolbachia* et des îles vertes pour 162 microlépidoptères dont 142 Gracillariidae.

2. Matériel et méthodes

2.1. Echantillonnage

162 individus (dont 142 individus appartenant à la famille des Gracillariidae et 20 individus d'autres familles) ont été échantillonnés en France et dans 12 pays différents. Les échantillons sont des adultes et des larves congelés ou dans l'alcool. Des feuilles minées ont été collectées en suivant le protocole décrit par Lopez Vaamonde *et al.* en 2003 et les individus émergents ont été congelés à -20°C.

2.2. Protocole

2.2.1. Mise au point du protocole d'extraction d'ADN

Le but est de développer un protocole permettant de détecter l'ADN de *Wolbachia* à partir de très petites quantités de tissus tel que les premiers stades larvaires où l'abdomen d'adultes de microlépidoptères. Les échantillons sont des individus adultes et larves fraîches conservés congelés, en alcool ou secs de l'espèce *Phyllonorycter blancardella* issues d'une population de Saché (Tours, France) infectée par *Wolbachia*.

En ce qui concerne les individus secs, nous avons utilisé que l'abdomen pour l'extraction d'ADN, le reste du corps de l'adulte servant à l'identification ont été déposés à l'INRA d'Orléans comme collection de référence.

Pour tester l'efficacité des extractions, un gène de l'insecte et un gène de *Wolbachia* (respectivement Ef1 alpha et 16S W) sont ensuite amplifiés par réaction de polymérisation en chaîne (PCR). Une précédente extraction contenant les gènes de *wolbachia* a été utilisée comme témoin positif.

Test 1 : La première extraction a été effectuée avec le kit DNeasy Blood & Tissue (Qiagen, France) en suivant le protocole du kit sur deux individus adultes.

Test 2 : Pour améliorer l'extraction, le temps d'incubation du broyat avec la protéinase K visant à libérer l'ADN des cellules est augmenté à une nuit et les volumes des solutions d'extractions sont

doublés. Ce test a été effectué avec deux kits différents : le kit DNeasy Blood & Tissue et QiaAMP DNA mini kit (Qiagen, France) sur une larve et un adulte congelés pour chaque kit.

Test 3 : L'ADN de trois individus, deux adultes et une larve congelés, a été extrait en utilisant le protocole du teste 2 mais en en ajoutant de l'ARN carrier lors de l'incubation avec la protéinase K afin de rendre plus disponible l'ADN et en mélangeant préalablement le broyat avec une seringue.

Test 4 : L'extraction a ensuite été testée sur deux adultes ,deux larves et deux abdomen d'individus sec avec le Microkit XS Nucleospin (Machery Nagel, France) en suivant le protocole du kit (annexe 1) excepté pour l'incubation avec la protéinase K encore augmenté à une nuit et l'élution qui a été faite en deux temps (2 fois 10 microlitres de tampon d'élution).

Protocole final d'expérimentation : D'après les résultats des tests, le Microkit XS Nucleospin a été choisi pour extraire l'ADN des adultes et larve congelés ou en alcool. Le protocole du kit (annexe 1) à été suivi excepté pour l'incubation avec la protéinase K encore augmenté à une nuit et l'élution qui a été faite en deux temps (2 fois 10 microlitres de tampon d'élution).

Les gènes d'intérêt sont ensuite amplifiés par réaction de polymérisation en chaine (PCR).

2.2.2. Choix des gènes d'intérêt

2.2.2.1. Les gènes de l'insecte

Les gènes de l'insecte doivent servir à reconstruire une phylogénie des mineuses et à identifier les échantillons collectés au niveau de l'espèce. Ils doivent donc être informatifs de l'histoire évolutive au niveau de l'espèce mais aussi à un niveau supérieur.

Pour identifier les échantillons, le gène de la cytochrome oxydase mitochondriale (COI) a été utilisé: C'est une séquence de 658 paires de bases qui est utilisée pour le barcoding. Le barcoding est l'utilisation d'un seul marqueur génétique (i. e. COI) pour assigner un nom d'espèce connue à un spécimen non identifié. Le DNA barcoding a été récemment montré comme étant une technique valide pour identifier plusieurs espèces de Gracillariidae (De Prins *et al.*, 2009 ; Langmaid *et al.*, 2011).

Sur les 162 individus échantillonnés, 43 avaient déjà été barcodés et les 119 nouveaux barcodes seront ajoutés à la base de donnée BOLD SYSTEMS (www.barcodinglife.org).

Pour la reconstruction phylogénique, trois gènes nucléaires ont été testés:

Le gène de la Carbamoyl-phosphate synthetase 2, aspartate transcarbamylase, et dihydroorotase (CAD). C'est un gène d'environ 6 600 paires de bases présent en une seule copie chez les insectes

holométaboles. Il est très informatif avec une grande utilité en phylogénie (Moulton et Wiegmann, 2003)

Le gène Ef1 alpha : Elongation-factor 1-alpha, est un gène de 519 bp codant pour la sous unité alpha du facteur d'élongation 1 entrant dans le processus de traduction de l'ADN (Kaiser *et al.*, 2010).

Gène histone 3 (H3) : C'est un gène d'environ 400 paires de bases codant pour une sous-unité protéique du nucléosome qui maintient les molécules d'ADN (Svenson et Whiting, 2004). Il a été montré que ce gène nucléaire est informative pour reconstruire la phylogénie des Gracillariidae (Kawahara *et al.*, sous presse).

Après plusieurs tests, le gène de l'histone 3 s'est révélé être le plus facilement amplifié avec le moins de bandes parasites. C'est donc celui qui a été choisi pour reconstituer la phylogénie des mineuses en combinaison avec le gène mitochondriale COI.

2.2.2.2. Les gènes de *Wolbachia*

Les gènes de la bactérie doivent permettre de détecter sa présence de la manière la plus fiable possible.

Gène 16S code pour un ARN ribosomique. C'est une séquence d'environ 600 paires de bases. Les amorces utilisées sont très spécifiques de *Wolbachia* et ont une assez bonne sensibilité (Simoes *et al.*, 2011). Cependant, comme la sensibilité n'est pas maximum, les échantillons pour lesquels le 16S n'a pas été amplifié sont testés avec FbpA (Simoes *et al.*, 2011).

Gène FbpA : C'est un gène d'environ 500 paires de bases codant pour la fructose bisphosphate aldolase qui est probablement impliquée dans la gluconéogenèse (Baldo *et al.*, 2006). Les amorces pour le FbpA de *Wolbachia* permettent une détection des bactéries avec une grande sensibilité mais elles manquent cependant de spécificité. En effet, elles peuvent amplifier des gènes d'autres bactéries proches de *Wolbachia*. Pour cette raison, les gènes FbpA amplifiés doivent être séquencés pour que l'on soit certains que les bactéries soient des *Wolbachia* (Simoes *et al.*, 2011).

gène		amorce	référence
Histone 3	forward	ATG GCT CGT ACC AAG CAG ACG GC	Svenson et Whiting, 2004
	reverse	ATA TCC TTG GGC ATG ATG GTG AC	
COI	forward	ATT CAA CCA ATC ATA AAG ATA T	Hebert <i>et al.</i> , 2004
	reverse	TAA ACT TCT GGA TGT CCA AAA A	

16Sw	forward	CAT ACC TAT TCG AAG GGA TAG	Werren <i>et al.</i> , 2000
	reverse	AGC TTC GAG TGA AAC CAA TTC	
FbpA	forward	GCT GCT CCR CTT GGY WTG AT	Baldo <i>et al.</i> , 2006
	reverse	CCR CCA GAR AAA AYY ACT ATT C	
Ef1-alpha	forward	GGG AAA TGG CAA GCA AAA TGG	Serbielle <i>et al.</i> , 2009
	reverse	CAT CGC ACT AAG ACC CAC C	
CAD	forward	GGT GTG ACT ACA GCT TGT TTT GAA CC	Regier, 2008.
	reverse	TTR TTN GGN ARY TGN CCN CCC AT	

Tableau 1. Amorces utilisées pour chaque gène testé.

2.2.3. Protocole de PCR

Pour chacun des gènes étudiés, 2µL d'ADN extrait sont utilisés avec 1 unité de Goldstar polymérase (Eurogentec, France), 0.2 mM de dNTP, 1.5 mM de MgCl₂ et 50 pmol de chaque amorce.

Pour les gènes **16S** et **FbpA**, l'ADN est d'abord dénaturé 4 minutes à 95°C suivi de 40 cycles d'une minute de dénaturation à 95°C, une minute d'hybridation à 50°C et une minute d'élongation à 72°C. Puis une dernière élongation est réalisée à 72°C durant 10 minutes.

Pour le gène **Histone 3**, l'ADN est d'abord dénaturé 4 minutes à 95°C suivi de 40 cycles d'une minute de dénaturation à 95°C, une minute d'hybridation à 50°C et une minute d'élongation à 72°C. Puis une dernière élongation est réalisée à 72°C durant 10 minutes.

Pour le gène **CO1**, l'ADN est d'abord dénaturé 4 minutes à 95°C suivi de 40 cycles d'une minute de dénaturation à 95°C, une minute d'hybridation à 50°C et une minute d'élongation à 72°C. Puis une dernière élongation est réalisée à 72°C durant 10 minutes selon le protocole utilisé par Hajibabaei *et al.*, en 2005.

Pour le gène **Ef1-alpha**, l'ADN est dénaturé 5 minutes à 94°C suivi de 30 cycles de 30 secondes de dénaturation à 95°C, 30 secondes d'hybridation à 55°C et une minute d'élongation à 72°C. Puis une dernière élongation est réalisée à 72°C durant 7 minutes.

Pour le gène **CAD**, l'ADN est dénaturé 3 minutes à 94°C suivi de 35 cycles de 30 secondes de dénaturation à 94°C, 30 secondes d'hybridation à 52°C et 1 minute 30 d'élongation à 72°C. Puis une dernière élongation est réalisée à 72°C durant 10 minutes.

2.2.4. Protocole de purification de PCR

Le produit de PCR est ensuite purifié avec le **kit Nucleospin Extract II** (Macherey-Nagel, France) en suivant le protocole du kit (annexe 2) mais en augmentant le temps d'incubation de l'élution à 15 minutes et le temps de centrifugation d'élution à 2 minutes.

2.2.5. Protocole de séquençage

Les différents gènes sont ensuite séquencés à partir de chaque extrémité (5' et 3') avec un séquenceur capillaire d'ADN (ABI PRISM 3100, Applied Biosystems, France). Le séquençage n'étant fiable que sur environ 400 paires de bases, les gènes sont séquencés par les deux extrémités ce qui nous permet d'obtenir toute la séquence avec une bonne fiabilité. Le reste de l'ADN extrait est conservé à -20°C. La PCR de séquençage est réalisée avec 4µL de mix RR (Kit de séquençage commercial), 10 pmol d'amorces et 5 à 20 ng d'ADN. Le programme du thermocycleur est le suivant : 25 cycles de 10 secondes à 96°C, 5 secondes à 50°C et 4 minutes à 60°C. Le produit de la PCR de séquençage est ensuite purifié. L'ADN est précipité avec une solution d'éthanol à 67,5% et une incubation 15 minutes à température ambiante. Les tubes sont ensuite centrifugés à 3000g durant 45 minutes et à 4°C. Puis l'ADN est lavé avec une solution d'éthanol à 70% et une centrifugation 3000g durant 10 minutes. La solution d'éthanol est ensuite enlevée, puis le culot d'ADN est repris dans du formamide désionisé.

2.3. Analyses

2.3.1. Analyse phylogénétique

Une fois le gène COI séquencé, les séquences ont été alignées avec 1398 autres séquences CO1 de différents Gracillariidae téléchargées sur la base de données BOLD SYSTEMS et contenues dans 4 projets : GRSLO (Gracillariidae of slovenia, Austria and Albania), GRPAL (Gracillariidae of the Palearctic region) les deux projets dirigés par Carlos Lopez Vaamonde, LEFIG (Lepidoptera of Finland) dirigé par Marko Mutanen et PHALA (Lepidoptera of the Alps) dirigé par Peter Huemer. Un arbre phylogénétique Neighbour-Joining a été construit à partir de ces 1398 séquences auxquelles s'ajoutent les 138 séquences des échantillons utilisés. Cette méthode nous a permis de déterminer les espèces de nos échantillons en regardant la position de nos échantillons dans l'arbre.

Les séquences sont assemblées et alignées avec le logiciel Geneious Pro trial 5.3.6. (Biomatters). Les analyses phylogénétiques ont été faites, suivant deux méthodes, à l'aide du logiciel PAUP4.0b10 (Swofford DL (1998). PAUP*: Phylogenetic Analysis Using Parsimony (*and others methods), v.4.0b. Sinauer, Sunderland, MA.)

La méthode du maximum de vraisemblance : Cette méthode repose sur la probabilité d'observer un arbre selon un modèle spécifique de changement de caractère établi à partir des données. Pour

établir ce modèle, le logiciel modeltest a été utilisé (Posada et Crandall, 1998). La robustesse des branches de l'arbre ainsi obtenu est évaluée grâce à 1000 répétitions reconstructions à partir d'un ré-échantillonnage aléatoire des nucléotides au sein de chaque séquence (bootstrap).

Parmi les 162 échantillons testés, certains n'ont amplifié que le gène CO1 d'autres que le gène de l'histone 3. Les deux gènes ont été combinés pour estimer la phylogénie, tous les échantillons qui ont amplifié le gène COI sont utilisés, les 17 séquences d'histone manquantes sont remplacés par des N indiquant l'absence de données.

Pour la méthode du maximum de vraisemblance, les séquences doivent être de la même taille car les différences de taille sont interprétées comme des insertions/délétions. Les extrémités des séquences sont alors coupées et les séquences trop courtes (108 et 127) sont retirées.

2.3.2. Analyse de corrélation

Le logiciel Mesquite version 2.7.4 (<http://mesquiteproject.org/mesquite/mesquite.html>) a été utilisé pour tester la corrélation de l'évolution de deux traits binaires discrets (présence/absence d'îles vertes et *Wolbachia*). Les données consistent en une liste de 128 mineuses de feuilles dont 116 Gracillariidae. La présence ou absence d'îles vertes a été observée pour 110 individus et la présence ou absence de *Wolbachia* est connue pour 125 mineuses. La valeur 1 a été assignée à la présence d'îles vertes et à la présence de *Wolbachia*. L'absence de ces caractères est notée 0. L'île verte est le caractère 1 et *Wolbachia* le caractère 2. Pour les espèces ou la valeur de ces caractères est incertaines, un tiret est assigné à la place du nombre. Tout d'abord, l'histoire évolutive de chacun des caractères a été retracée par la méthode du maximum de vraisemblance. Pour cela, le logiciel nécessite un arbre entièrement résolu, sans polytomies. Deux clades ont du être supprimés : L'individu numéro 2 (l'un des deux *Tischeria ekebladella*) et un groupe comportant les individus numéro 8 et 6, (respectivement *Anthophila fabriciana* et *Lyonetia clerkella*) qui formaient un outgroup.

Afin de faire l'analyse de corrélation, le logiciel ne supportant pas les données manquantes, seuls les 106 mineuses de feuilles comportant les informations sur la présence d'île verte et de *Wolbachia* ont été gardées pour l'analyse. L'analyse repose sur la comparaison de la vraisemblance de différents modèles d'évolution : 8 modèles avec dépendance des caractères et 4 avec indépendance des caractères. L'hypothèse d'indépendance des caractères est l'hypothèse nulle rejetée si la p-value est inférieur à 0.05. La p-value est calculée par 1000 simulations avec un test de Monte Carlo (Pagel, 1994).

3. Résultats

3.1. Expériences de mise au point du protocole d'extraction

Test 1 : A partir des deux extractions, seul le gène de l'insecte a été amplifié.

Test 2 : A partir de ces 4 extractions, seul le gène de l'insecte a été amplifié à partir de l'adulte comme de la larve.

Test 3 : Pour les trois extractions, seul le gène bactérien a pu être amplifié.

Test 4 : A partir des adultes et des larves congelés et en alcool le gène bactérien a été amplifié pour les 4 extractions et celui de l'insecte a été amplifié pour les 2 larves et un des adultes. Aucune amplification n'a été possible à partir des abdomens secs.

Sur la base de ces résultats, le Microkit XS Nucleospin (test 4) a été choisis comme la meilleure méthode pour extraire l'ADN de mineurs de feuilles, adultes et larves, et de leurs *Wolbachia* associées.

3.2. PCR et séquençage

Les résultats des PCR et des séquençages sont présentés dans les Annexe 3 et 4. Sur les 162 extractions, le gène histone 3 a été amplifié pour 146 échantillons (**89.57%**). Pour le gène COI, 119 PCR ont été effectuées (les séquences des 43 autres échantillons étant déjà disponibles sur la base de données BOLD). Sur les 119 PCR, Le gène COI a été amplifié pour 111 échantillons (**93.28%**). Pour le gène 16S de *Wolbachia*, sur les 162 PCR effectués, le gène a été amplifié à partir de 51 échantillons. Pour les échantillons à partir desquels la PCR 16S n'a pas donné d'amplification, les PCR avec le gène FbpA ont été effectués. Sur les 111 échantillons, pour 5 individus (19, 22, 23, 24 et 120), il ne restait pas suffisamment de produit d'extraction pour effectuer la PCR. 106 individus ont donc été testés pour le gène Fbpa et seuls 2 amplification ont été effectuées à partir des individus 10 et 157.

Les résultats du séquençage sont présentés dans le Annexe 4. Seuls les gènes de l'insecte sont séquencés. Sur les 146 produits de PCR séquencés pour l'histone 3 131 séquences ont été obtenues (**89.73%**). Sur les 111 produits de PCR COI séquencés, 96 séquences ont été obtenues (**86.49%**). En ajoutant les 43 séquences de COI obtenues préalablement, le barcode est obtenu pour 139 individus, dont 119 ont également la séquence Histone 3. Cependant, le gène COI d'un parasitoïde (*Campopleginae sp.*) et d'une *Wolbachia* ont été amplifiés et séquencés. Ces échantillons (respectivement les numéros 18 et 25) ont donc été exclus du reste des analyses.

3.3. Barcode et identification

Au total, 139 individus ont été barcodés (Tableau 2). 2 d'entre eux sont des amplifications non ciblés (l'amplification de CO1 de *Wolbachia* et du parasitoïde). Sur les 137 individus restant pour l'analyse, 120 individus se répartissent dans 70 espèces de Gracillariidae et 17 individus se répartissent dans 13 espèces de différentes familles (utilisés ultérieurement comme outgroup pour l'analyse). Toutes les séquences barcodées seront visibles via le « Barcode of Life Data systems » (BOLD; www.barcodinglife.org) (Ratnasingham et Hebert 2007) au sein du projet « Gracillariidae of the Palearctic region » (code GRPAL). Les informations sur les échantillons et les séquences pourront être trouvés dans ce projet en suivant le lien « view all records » et par les liens « specimen page » ou « sequence page » pour chaque enregistrement individuel. Les séquences seront également soumises à GenBank (un mot de passe sera nécessaire pour accéder aux données jusqu'à ce qu'elles soient publiés).

Les individus adultes ont été préalablement identifiés morphologiquement par Carlos Lopez-Vaamonde. Le résultat des identifications à la fois par blast et par reconstruction phylogénétique (Neighbour Joining) sont dans le Tableau 2. On notera que cette étude inclus 7 nouvelles espèces également examinées par Carlos Lopez-Vaamonde (2 espèces de *Cameraria*, 3 espèces de *Phyllonorycter* et 2 espèces d'un nouveau genre).

3.4. Reconstruction phylogénique

L'arbre phylogénétique obtenu par maximum de vraisemblance est montré (Figure 1) comporte 54 nœuds ayant des valeurs de bootstrap supérieur à 70%. Certains groupes monophylétiques sont bien supportés tel que le genre *Phyllonorycter* et son groupe sœur *Cameraria*. La longueur des branches représente la quantité de changements évolutifs.

3.5. Reconstruction de l'histoire évolutive des caractères

Wolbachia :

Sur les 134 individus de l'arbre (137 barcodés moins 3 enlevés pour éviter les polytomies), 42 sont infectés par *Wolbachia*. L'infection par *Wolbachia* concerne donc environ **31%** des individus testés. L'histoire évolutive obtenue par maximum de vraisemblance est indiquée sur l'arbre (également construit par maximum de vraisemblance) présenté en Figure 2. La proportion de noir indique la probabilité d'être infecté par *Wolbachia*. On peut constater que pour la plupart des nœuds, la probabilité d'infection par *Wolbachia* est d'environ 50%. Des probabilités d'infections plus

plante hôte		identifiant	espèce	famille	Wolbachia	Iles vertes observées	lieu
famille							
Aceraceae	Acer	27	<i>Caloptilia semifascia</i>	Gracillariidae	oui	non	UK
Aceraceae	Acer	163	<i>Phyllonorycter oxycanthae</i>	Gracillariidae	non	oui	France
Aceraceae	Acer	162	<i>Phyllonorycter pyrifoliella?</i>	Gracillariidae	non	oui	France
Aceraceae	Acer	132	<i>Phyllonorycter joannisi</i>	Gracillariidae	non	-	France
Aceraceae	<i>Acer campestre</i>	129	<i>Phyllonorycter acerifoliella</i>	Gracillariidae	oui	non	slovenie
Aceraceae	<i>Acer campestre</i>	139	<i>Phyllonorycter acerifoliella</i>	Gracillariidae	non	non	Albanie
Aceraceae	<i>Acer japonicum</i>	35	<i>Cameraria sp2</i>	Gracillariidae	non	non	Japon
Aceraceae	<i>Acer platanoides</i>	52	<i>Phyllonorycter joannisi</i>	Gracillariidae	oui	oui	
Aceraceae	<i>Acer pseudoplatanus</i>	80	<i>Caloptilia rufipennella</i>	Gracillariidae	non	non	UK
Adoxaceae	<i>Viburnum</i>	142	<i>Phyllonorycter n sp.3</i>	Gracillariidae	non	non	Albanie
Anacardiaceae	<i>Rhus javanica</i>	105	<i>Eteoryctis deversa</i>	Gracillariidae	non	non	Japon
Araliaceae	<i>Hedera rhombea</i>	110	<i>Eumetriochroa hederæ</i>	Gracillariidae	non	non	Japon
Asteraceae	<i>Solidago</i>	51	<i>Cremastobombycia solidaginis</i>	Gracillariidae	non	-	Canada
Betulaceae	<i>Alnus</i>	136	<i>Phyllonorycter kleemannella</i>	Gracillariidae	oui	oui	Albanie
Betulaceae	<i>Alnus</i>	125	<i>Phyllonorycter rajella</i>	Gracillariidae	oui	oui	Albanie
Betulaceae	<i>Alnus</i>	146	<i>Phyllonorycter rajella</i>	Gracillariidae	oui	oui	Albanie
Betulaceae	<i>Alnus</i>	101	<i>Phyllonorycter stettinensis</i>	Gracillariidae	non	non	Albanie
Betulaceae	<i>Alnus cordata</i>	66	<i>Phyllonorycter kleemannella</i>	Gracillariidae	oui	oui	UK
Betulaceae	<i>Alnus glutinosa</i>	120	<i>Caloptilia elongella</i>	Gracillariidae	?	non	UK
Betulaceae	<i>Alnus glutinosa</i>	69	<i>Caloptilia falconipennella</i>	Gracillariidae	non	non	UK
Betulaceae	<i>Alnus glutinosa</i>	134	<i>Phyllonorycter rajella</i>	Gracillariidae	non	oui	slovenie
Betulaceae	<i>Alnus glutinosa</i>	73	<i>Phyllonorycter rajella</i>	Gracillariidae	oui	oui	UK
Betulaceae	<i>Alnus incarna</i>	77	<i>Phyllonorycter strigulatella</i>	Gracillariidae	non	non	UK
Betulaceae	<i>Alnus slotinosa</i>	130	<i>Phyllonorycter kleemannella</i>	Gracillariidae	oui	oui	slovenie
Betulaceae	<i>Aulne</i>	53	<i>Phyllonorycter rajella</i>	Gracillariidae	oui	oui	France
Betulaceae	<i>Betula pubescens</i>	63	<i>Parornix betulæ</i>	Gracillariidae	non	-	UK
Betulaceae	<i>Carpinus</i>	145	<i>Phyllonorycter esperella</i>	Gracillariidae	oui	non	Albanie
Betulaceae	<i>Carpinus</i>	161	<i>Phyllonorycter esperella</i>	Gracillariidae	oui	-	France
Betulaceae	<i>Carpinus</i>	133	<i>Phyllonorycter schreberella</i>	Gracillariidae	non	non	Albanie
Betulaceae	<i>Carpinus</i>	159	<i>Phyllonorycter tenerella</i>	Gracillariidae	non	-	France
Betulaceae	<i>Carpinus</i>	158	<i>Phyllonorycter tenerella</i>	Gracillariidae	non	-	France
Betulaceae	<i>Carpinus betulas</i>	68	<i>Phyllonorycter esperella</i>	Gracillariidae	oui	non	UK
Betulaceae	<i>Corylus</i>	49	<i>Phyllonorycter coryli</i>	Gracillariidae	oui	oui	France
Caprifoliaceae	<i>Lonicera</i>	122	<i>Phyllonorycter emberizaepennella</i>	Gracillariidae	non	non	
Caprifoliaceae	<i>Lonicera</i>	48	<i>Phyllonorycter emberizaepennella</i>	Gracillariidae	non	non	Belgique
Caprifoliaceae	<i>Lonicera</i>	78	<i>Phyllonorycter trifasciella</i>	Gracillariidae	non	non	UK
Clusiaceae	<i>Clusia nemorosa</i>	111	<i>new genus 2 sp 1 (inselberg Trinité)</i>		non	non	Guyane
Fabaceae	<i>Puleraria lobata</i>	107	<i>Spulerina</i>	Gracillariidae	non	non	Japon
Fabaceae	<i>Robinia</i>	58	<i>Parctopa robinella</i>	Gracillariidae	non	non	France
Fabaceae	<i>Robinia</i>	30	<i>Phyllonorycter robinella</i>	Gracillariidae	oui	-	lituanie
Fabaceae	<i>Robinia</i>	31	<i>Phyllonorycter robinella</i>	Gracillariidae	oui	-	lituanie
Fagaceae	<i>Fagus sylvatica</i>	65	<i>Phyllonorycter maestingella</i>	Gracillariidae	oui	oui	UK
Fagaceae	<i>Quercus</i>	151	<i>Caloptilia alchimiella</i>	Gracillariidae	oui	non	slovenie
Fagaceae	<i>Quercus</i>	150	<i>Phyllonorycter delitella</i>	Gracillariidae	oui	oui	slovenie
Fagaceae	<i>Quercus</i>	154	<i>Phyllonorycter kuhlweiniella</i>	Gracillariidae	non	-	slovenie
Fagaceae	<i>Quercus</i>	152	<i>Phyllonorycter scitulella?</i>	Gracillariidae	oui	oui	slovenie
Fagaceae	<i>Quercus cerris</i>	153	<i>Phyllonorycter parisiella</i>	Gracillariidae	oui	oui	slovenie
Fagaceae	<i>Quercus ilex</i>	116	<i>Acrocercops brongniardella</i>	Gracillariidae	oui	non	UK
Hippocastanaceae	<i>Aesculus hippocastanum</i>	39	<i>Cameraria ohridella</i>	Gracillariidae	non	non	lituanie
Hypericaceae	<i>Hypericum sp</i>	75	<i>Euspilapteryx auroguttella</i>	Gracillariidae	non	non	UK
Malvaceae	<i>Trochetia boutoniana</i>	86	<i>Phyllonorycter n sp. 2</i>	Gracillariidae	non	non	Ile Maurice
Malvaceae	<i>Trochetia boutoniana</i>	87	<i>Phyllonorycter n sp. 2</i>	Gracillariidae	non	non	Ile Maurice
Malvaceae	<i>Trochetia boutoniana</i>	88	<i>Phyllonorycter n sp. 2</i>	Gracillariidae	non	non	Ile Maurice
Malvaceae	<i>Trochetia parviflora</i>	92	<i>Phyllonorycter n sp. 2</i>	Gracillariidae	non	non	Ile Maurice
Menispermaceae	<i>Stephania sp.</i>	108	<i>Phodoryctis stephaniae</i>	Gracillariidae	non	non	Japon
Mimosaceae	<i>Acacia macracantha</i>	61	<i>Chileoptilia yaraella</i>	Gracillariidae	oui	non	Chili
Mimosaceae	<i>Acacia macracantha</i>	62	<i>new genus 1 sp. 2 (Guyane)</i>		non	non	Guyane/Laussat
Myrsinaceae	<i>Myrsine seguinii</i>	109	<i>Artifodina japonica</i>	Gracillariidae	non	non	Japon
Oleaceae	Oleaceae	28	<i>Gracillaria syringella</i>	Gracillariidae	oui	non	UK
Platanaceae	<i>Platanus sp.</i>	57	<i>Phyllonorycter platani</i>	Gracillariidae	non	oui	UK
Platanaceae	<i>Platanus sp.</i>	50	<i>Phyllonorycter platani</i>	Gracillariidae	oui	oui	Grece
Rosaceae	<i>Crataegus</i>	157	<i>Phyllonorycter oxycanthae</i>	Gracillariidae	?	oui	France
Rosaceae	<i>Crataegus</i>	123	<i>Phyllonorycter pyrifoliella?</i>	Gracillariidae	non	non	slovenie
Rosaceae	<i>Crataegus monogyna</i>	64	<i>Parornix anglicella</i>	Gracillariidae	non	-	UK
Rosaceae	<i>Crataegus</i>	160	<i>Phyllonorycter oxycanthae</i>	Gracillariidae	non	oui	France
Rosaceae	<i>Malus</i>	141	<i>Phyllonorycter blancardella</i>	Gracillariidae	oui	oui	Albanie

Rosaceae	Malus	137	Phyllonorycter corylifoliella	Gracillariidae	non	non	Albanie
Rosaceae	Malus	155	Phyllonorycter corylifoliella	Gracillariidae	non	non	Albanie
Rosaceae	Prunus spinosa	126	Phyllonorycter cerasicolella	Gracillariidae	oui	oui	Albanie
Rosaceae	Prunus spinosa	143	Phyllonorycter cerasicolella	Gracillariidae	oui	oui	Albanie
Rosaceae	Prunus spinosa	144	Phyllonorycter cerasicolella	Gracillariidae	oui	oui	Albanie
Rosaceae	Rosaceae	95	Phyllonorycter sorbi	Gracillariidae	non	non	UK
Rosaceae	Rosales	147	Phyllonorycter corylifoliella	Gracillariidae	non	non	France
Rosaceae	Rosales	148	Phyllonorycter corylifoliella	Gracillariidae	non	non	France
Rosaceae	Sorbier	54	Phyllonorycter pyrifioliella?	Gracillariidae	oui	oui	France
Salicaceae	Populus	44	Phyllonorycter comparella	Gracillariidae	oui	oui	russe
Salicaceae	Populus	43	Phyllonorycter populifoliella	Gracillariidae	non	-	russe
Salicaceae	Populus alba	127	Phyllonorycter comparella	Gracillariidae	oui	-	Albanie
Salicaceae	Populus alba	97	Phyllonorycter comparella	Gracillariidae	non	non	Albanie
Salicaceae	Populus alba	98	Phyllonorycter comparella	Gracillariidae	non	non	Albanie
Salicaceae	Populus alba	99	Phyllonorycter comparella	Gracillariidae	non	non	Albanie
Salicaceae	Populus alba	100	Phyllonorycter comparella	Gracillariidae	non	non	Albanie
Salicaceae	Populus alba	45	Phyllonorycter issikii	Gracillariidae	oui	non	russe
Salicaceae	Populus migra	46	Phyllonorycter comparella	Gracillariidae	oui	oui	France
Salicaceae	Populus migra	47	Phyllonorycter comparella	Gracillariidae	oui	oui	France
Salicaceae	Salix aurita	102	Phyllonorycter hilarella	Gracillariidae	non	non	UK
Salicaceae	Salix aurita	71	Phyllonorycter salicicolella	Gracillariidae	non	non	UK
Salicaceae	Salix aurita	118	Phyllonorycter salicicolella	Gracillariidae	non	non	UK
Salicaceae	Salix caprea	67	Phyllonorycter dubitella	Gracillariidae	non	-	UK
Salicaceae	Salix caprea	72	Phyllonorycter hilarella	Gracillariidae	non	non	UK
Salicaceae	Salix caprea	117	Phyllonorycter hilarella	Gracillariidae	non	non	UK
Salicaceae	Salix caprea	128	Phyllonorycter salicicolella	Gracillariidae	non	non	Albanie
Salicaceae	Salix caprea	131	Phyllonorycter salicicolella	Gracillariidae	non	non	slovenie
Salicaceae	Salix cinerea	79	Caloptilia stigmatella	Gracillariidae	non	non	UK
Salicaceae	Salix cinerea	81	Phyllonorycter ramulicola	Gracillariidae	non	non	UK
Salicaceae	Salix cinerea	82	Phyllonorycter salicicolella	Gracillariidae	non	non	UK
Salicaceae	Salix cinerea	84	Phyllonorycter salictella	Gracillariidae	non	-	UK
Salicaceae	Salix cinerea	70	Phyllonorycter salictella	Gracillariidae	non	non	UK
Salicaceae	Salix caprea	149	Phyllonorycter salicicolella	Gracillariidae	non	non	slovenie
Salicaceae	Salix selissefolia	32	Cameraria sp1	Gracillariidae	non	non	Japon
Salicaceae	Salix selissefolia	34	Cameraria sp1	Gracillariidae	non	non	Japon
Salicaceae	Salix viminalis	121	Phyllonorycter salicicolella	Gracillariidae	non	non	UK
Salicaceae	Salix viminalis	119	Phyllonorycter salictella	Gracillariidae	non	non	UK
Salicaceae	Salix viminalis	76	Phyllonorycter salictella	Gracillariidae	non	non	UK
Sterculiaceae	Dombeya	37	Phyllonorycter n sp. 1	Gracillariidae	non	non	Afrique du sud
Sterculiaceae	Dombeya	36	Phyllonorycter n sp. 1	Gracillariidae	non	non	Afrique du sud
Sterculiaceae	Dombeya acutangula	93	Phyllonorycter n sp. 2	Gracillariidae	non	non	Ile Maurice
Sterculiaceae	Dombeya mauritania	90	Phyllonorycter n sp. 2	Gracillariidae	non	non	Ile Maurice
Sterculiaceae	Dombeya mauritania	91	Phyllonorycter n sp. 2	Gracillariidae	non	non	Ile Maurice
Sterculiaceae	Ruizia cordata	89	Phyllonorycter n sp. 2	Gracillariidae	non	non	Ile Maurice
Tiliaceae	Tilia	38	Phyllonorycter issikii	Gracillariidae	non	non	lituanie
Tiliaceae	Tilia platyphyles	40	Phyllonorycter issikii	Gracillariidae	non	non	lituanie
Ulmaceae	Ulmus	138	Phyllonorycter schreberella	Gracillariidae	non	non	Albanie
Ulmaceae	Ulmus	156	Phyllonorycter schreberella	Gracillariidae	non	non	Albanie
Ulmaceae	Ulmus	96	Phyllonorycter tristigella	Gracillariidae	non	non	
Ulmaceae	Ulmus campestris	124	Phyllonorycter schreberella	Gracillariidae	non	non	Albanie
Ulmaceae	Ulmus procera	85	Phyllonorycter tristigella	Gracillariidae	non	non	UK
Ulmaceae	Ulmus sp.	83	Phyllonorycter tristigella	Gracillariidae	non	non	UK
Vitaceae	Parthenocissis tricuspidata	104	Spulerina parthenocissi	Gracillariidae	non	non	Japon
	-	25	Campopleginae sp.		oui		UK
	?	59	new genus 1 sp. 1 (Guyane)		non	non	Guyane/Laussat
Convolvulaceae	Convolvulaceae	11	Bedellia somnulentella	Bedelliidae	non	-	UK
Urticaceae	Urticaceae	8	Anthophila fabriciana	Choreutidae	non	-	UK
	?	10	Anthophila fabriciana	Choreutidae	?	-	UK
Caryophyllaceae	Caryophyllaceae	3	Coleophora solitariella	Coleophoridae	non	-	UK
Araliaceae	Humulus	13	Cosmopterix zieglereella	Cosmopterigidae	oui	-	UK
Poaceae	Poaceae ?	5	Elachista argentella	Elachistidae	oui	-	UK
Apiaceae	Apiaceae	20	Epermenia chaerophyllella	Epermeniidae	oui	non	UK
Poaceae	Poaceae	9	Glyphipterix simplicella	Glyphipterigidae	non	-	UK
Rosaceae	Malus	113	Leucoptera malifoliella	Lyonetiidae	non	non	France
Rosaceae	Malus	114	Leucoptera malifoliella	Lyonetiidae	non	non	France
Rosaceae	Malus	115	Leucoptera malifoliella	Lyonetiidae	non	non	France
Rosaceae	Malus	6	Lyonetia clerkeella	Lyonetiidae	non	-	UK
Onagraceae	Epilobium	12	Mompha epilobiella	Momphidae	non	-	UK
Fagaceae	Quercus	19	Ectoedemia heringella	Nepticulidae	?	oui	UK
	-	14	Hofmannophila pseudospretella	Oecophoridae	oui	non	UK
Fagaceae	Quercus	2	Tischeria ekebladella	Tischeriidae	oui	-	UK
Fagaceae	Quercus	55	Tischeria ekebladella	Tischeriidae	oui	oui	France

Tableau 2. Tableau récapitulatif des espèces utilisées pour la phylogénie et les analyses de corrélation classées par plantes hôtes pour les *Gracillariidae* et par espèces pour les autres familles.

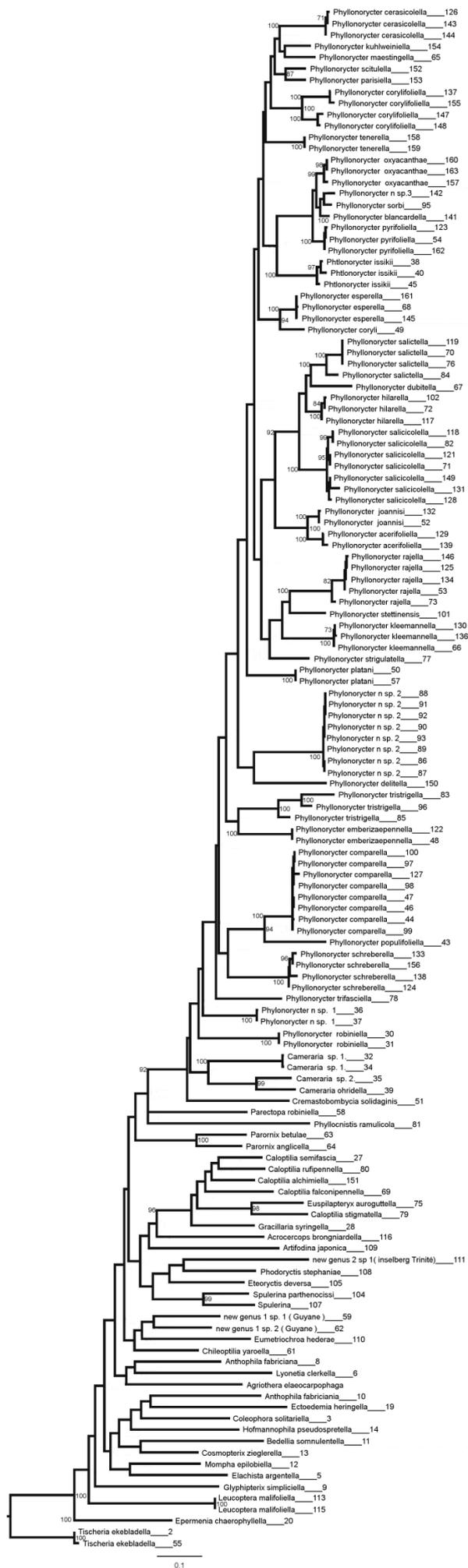


Figure 1. Phylogénie des différents individus échantillonnés

reconstruite selon la méthode de maximum de vraisemblance. Les longueurs de branches sont proportionnelles à la quantité d'évolution et en face des branches sont notés les valeurs de bootstrap supérieur à 70%.

importantes ne sont observées que pour des nœuds récents. La distribution de l'infection par *Wolbachia* sur la phylogénie de l'insecte montre que les mineuses de feuilles infectées par *Wolbachia* ne forment pas un groupe monophylétique bien supporté, excepté pour deux groupes formés de plusieurs spécimens de la même espèce (*Phyllonorycter oxyacanthae* et *Phyllonorycter rajella*). En effet, il semble que l'infection par *Wolbachia* ait eu lieu indépendamment plusieurs fois au cours de l'évolution des Gracillariidae. D'autre part, chez certaines espèces (4 espèces) comme, par exemple, *Phyllonorycter comparella* ou encore *Phyllonorycter rajella*, plusieurs individus ont été testés et on observe une variabilité intraspécifique de l'infection. De 1 à 8 individus sont échantillonnés par espèce avec une moyenne de 2 individus par espèces.

Iles vertes :

Sur les 134 individus utilisés pour cette étude, l'information la présence d'une île verte n'est pas disponible (ou non pertinente dans le cas des individus autres que mineurs de feuille) pour 24 individus. Sur les 110 individus pour lesquels l'information est disponible, l'île verte a été observée pour 30 d'entre eux (**27.2%**). L'histoire évolutive inférée par la méthode de maximum de vraisemblance est tracée sur l'arbre de la Figure 3. On peut noter que pour 3 espèces (*Phyllonorycter comparella*, *Phyllonorycter pyrifoliella* et *Phyllonorycter joannisii*), plusieurs individus ont été testés et que l'on observe du polymorphisme avec certains individus capables de faire des îles vertes et d'autres non.

3.6. Corrélation entre la présence d'îles vertes et la présence de *Wolbachia* :

avec île verte 28		sans île verte 78	
avec <i>Wolbachia</i> 23	sans <i>Wolbachia</i> 5	avec <i>Wolbachia</i> 8	sans <i>Wolbachia</i> 70
82.14%	17.86%	10.26%	89.74%

Tableau 3. Proportions d'infection par *Wolbachia* en fonction de la présence ou absence d'île verte.

Pour la corrélation, seuls sont pris en compte les individus mineuses de feuilles (128 individus) et pour lesquels les données de l'infection par *Wolbachia* et de la présence d'îles verte sont connues (**106 individus**). Dans le Tableau 3, on peut voir que sur 28 individus faisant des îles vertes, 23 sont infectés par *Wolbachia* (soit **82.14%**) et 5 individus (**17.86%**) ne sont pas infectés par *Wolbachia*. On voit également que le taux d'infection par *Wolbachia* est de **82.14%** chez les individus formant des îles vertes (28 spécimens) alors qu'il n'est que de **10.26%** chez les individus de formant pas d'îles vertes (78 spécimens).

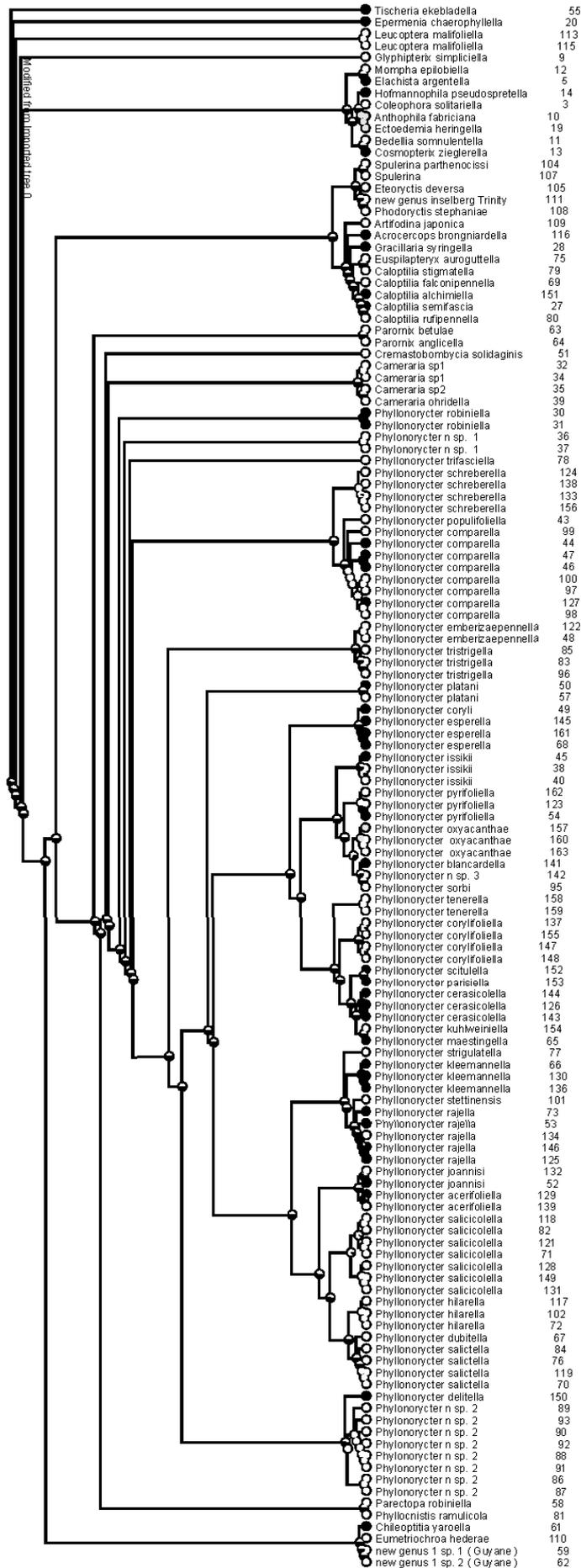


Figure 2. Reconstruction de l'histoire de l'infection par *Wolbachia* par la méthode du maximum de vraisemblance. La proportion de noir dans les cercles représente la probabilité d'être infecté par *Wolbachia*.

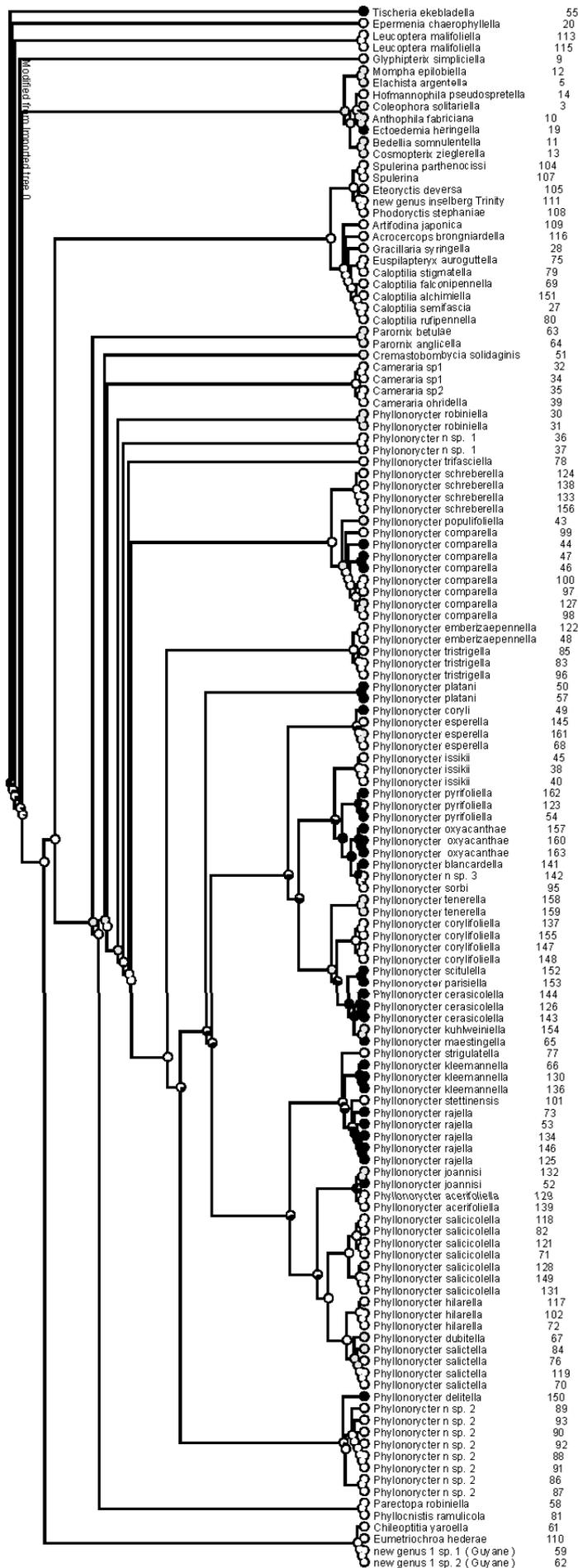


Figure 3. Reconstruction de l'histoire de la présence d'îles vertes par la méthode du maximum de vraisemblance. La proportion de noir dans les cercles représente la probabilité de former une île verte.

Sur la Figure 4, on peut voir l'arbre de maximum de vraisemblance des mineuses dupliqué, avec représenté sur celui de gauche, la reconstruction du caractère « île verte » et sur celui de droite, la reconstruction du caractère « *Wolbachia* ». On peut alors observer la congruence des deux caractères, et différencier plusieurs clades, parmi lesquels certains semblent présenter une corrélation entre les deux caractères et d'autres non.

Analyse statistique :

L'analyse conduite sur les 106 individus mineurs de feuilles sur l'arbre de maximum de vraisemblance, a donné les résultats suivants :

Pour les 8 modèles avec dépendance des caractères, le log de la vraisemblance est de : -86.00.

Pour les 4 modèles avec indépendance des caractères le log de la vraisemblance est de -114.34.

La différence est de 28.35 et la p-value pour 1000 simulations est de 0.0. On peut donc rejeter l'hypothèse d'indépendance de l'évolution des caractères à l'échelle de l'arbre.

Il y a donc une corrélation entre les îles vertes et la présence de *Wolbachia* chez les mineuses.

Plantes hôtes :

Les principales familles de plantes hôtes (les familles les plus représentées parmi les plantes hôtes des individus de l'étude) sont également représentée par un code couleur (Figure 4). On voit que l'utilisation de la plante hôte par les mineuses est phylogénétiquement conservé (les espèces proches se nourrissent sur des plantes proches phylogénétiquement). Par exemple les espèces *Phyllonorycter salicicolella*, *hilarella* et *salictella* forment un groupe monophylétique et ont toutes des plantes hôtes de la famille des *Salicaceae*.

4. Discussion

La mise au point d'une méthode d'extraction par le Microkit XS Nucleospin ouvre de nouvelles perspectives en terme de screening intensif.

Les tests réalisés ont permis d'établir un protocole d'extraction efficace à la fois sur des individus adultes et des larves et dans des conditions de conservation des individus divers (alcool, congélation). Seules les analyses sur individus secs n'ont pas fonctionnées. La mise au point de ce protocole d'analyse au cours de mon stage ouvre ainsi de plus grandes perspectives en favorisant l'analyse possible de multiples échantillons quelque soit leur origine géographique et indépendamment des conditions de stockage utilisées par les équipes susceptibles de nous fournir ces échantillons. Seule l'analyse d'échantillon de collections (musée etc...) reste pour l'instant inaccessible. Les difficultés de mise au point reposent sur le fait que l'extraction de l'ADN à la fois de

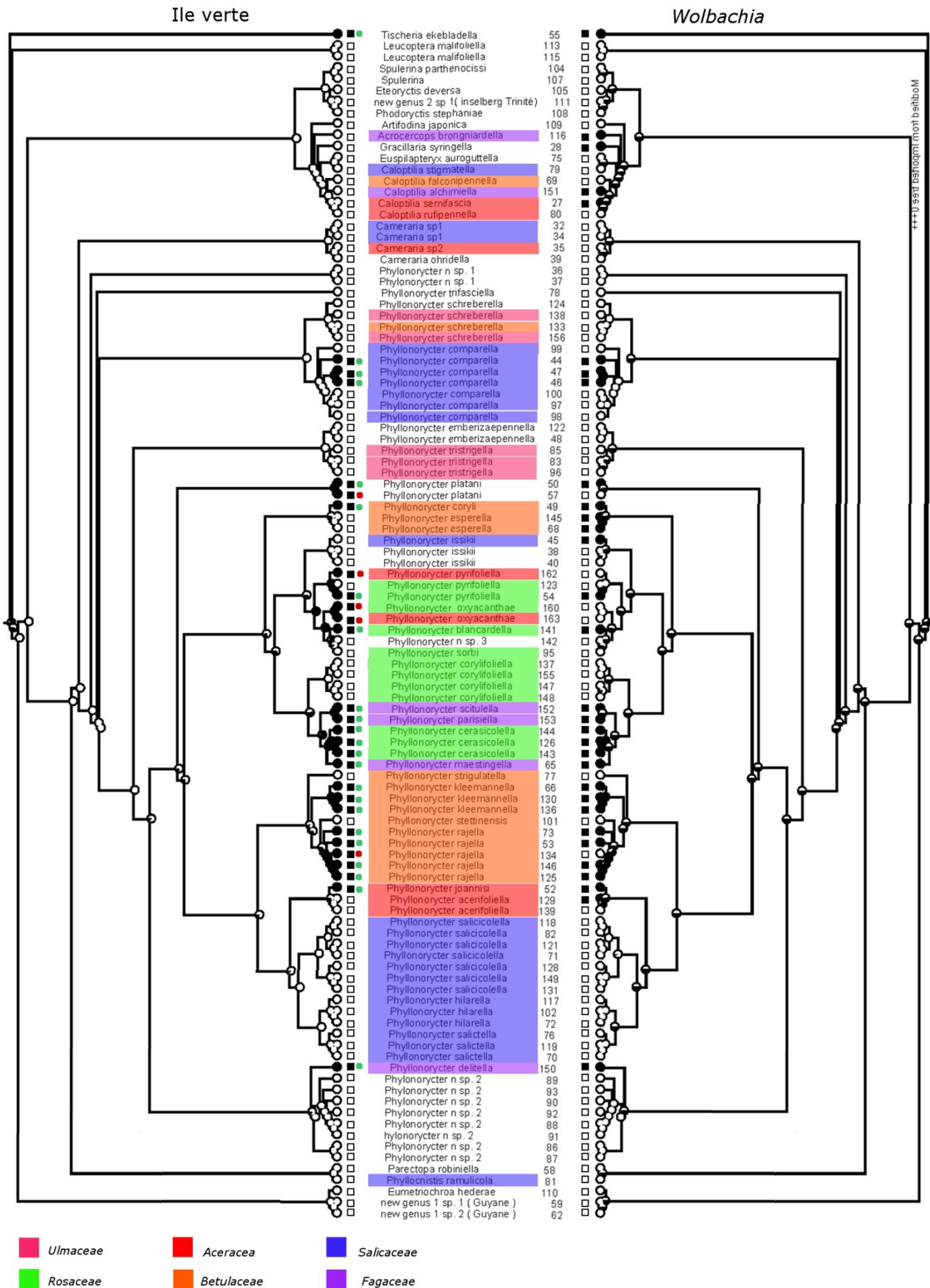


Figure 4. Mise en vis-à-vis de la reconstruction des caractères présence d'île verte et présence de *Wolbachia* chez les mineuses de feuilles pour lesquels l'information individuelle est connue pour les deux caractères. Un carré noir symbolise la présence du caractère, un carré blanc symbolise son absence. Les familles de plantes hôtes les plus représentées sont indiquées par un rectangle de couleur. La corrélation entre les deux caractères est significative (p -value = 0.0). Les points verts correspondent aux îles vertes avec présence de *Wolbachia* et les points rouges aux îles vertes sans *wolbachia*.

l'insecte et de la bactérie implique un compromis. En effet, la lyse des cellules (incubation avec la protéinase K et ARN carrier pour le test 3) doit être suffisamment poussée pour libérer l'ADN de la bactérie sans être trop forte pour ne pas dénaturer l'ADN de l'insecte. Le Microkit XS Nucleospin permet d'obtenir l'extraction de l'ADN de l'insecte et de la bactérie et de le concentrer suffisamment pour permettre l'amplification des gènes d'intérêt des 2 partenaires par PCR.

Le taux de réussite des amplifications pas PCR est assez élevé (89,6% pour l'histone 3 et 93,3% pour le CO1). Néanmoins, pour les échantillons 22,23 et 24, aucun des gènes testés n'a pu être amplifié, il est probable que l'ADN soit en trop faible concentration, ou dégradé.

En ce qui concerne la détection des *Wolbachia*, la faible proportion d'amplification du gène FbpA (2/107) montre que le gène 16S permet une bonne détection des bactéries. En effet, sur les 163 individus testés, seuls 2 échantillons n'ont pas amplifié le gène 16S alors qu'ils contenaient potentiellement *Wolbachia*. Les deux gènes FbpA amplifiés n'ayant pas encore été séquencés, on ne peut pas être certains que les deux échantillons contenaient des *Wolbachia*.

Le barcoding confirmé comme étant une méthode d'identifications efficace chez les Gracillariidae.

La méthode d'identification basé sur le barcoding des individus fait l'objet de discussions car il arrive que deux espèces différentes aient le même barcode (Schmidt et Sperling, 2008 ; Wiemers et Fiedler, 2007). Toutefois, les paires d'espèces n'ayant aucune divergence interspécifiques sont rares, comme le montrent Herbert *et al.*, (2009) dans une large étude de plus de 1300 espèces de lépidoptères de la moitié est de l'Amérique du nord. En ce qui concerne le groupe que nous avons étudié, le barcoding nous a permis de confirmer ou préciser la détermination préalablement effectuée sur des critères morphologiques et écologiques. Le barcoding constitue donc un bon outil pour l'identification des Gracillariidae qui sont des microlépidoptères avec des morphologies pouvant être parfois très proches. L'identification par barcoding permet de réduire les erreurs d'identification. Cette technique permet également de rendre plus accessible l'identification d'individus même en absence de systématiciens. Enfin, cette technique permet l'identification des adultes, mais surtout elle rend possible l'identification des larves.

De plus pour le cas des larves, elle permet de détecter la présence d'un parasitoïde, comme pour l'individu 25. Ceci permet de s'assurer lorsque l'on s'intéresse aux endosymbiontes susceptibles d'être présents que les *Wolbachia* détectées étaient bien celles des mineuses et non celles d'un éventuel parasitoïde. Les individus 25 et 18 (amplification du COI de *Wolbachia*) ont donc été exclus de l'analyse.

Les gènes utilisés sont informatifs pour expliquer l'histoire évolutive récente des mineuses.

Il y a un manque de résolution (faibles valeurs de bootstrap) sur les nœuds intermédiaires. Les gènes utilisés nous donnent une bonne résolution des liens entre taxons pour l'histoire évolutive récente mais l'information manque de robustesse pour ce qui est de l'histoire évolutive plus ancienne des taxons. Ce manque de résolution a déjà été constaté dans plusieurs études sur les lépidoptères (Lopez-Vaamonde *et al.*, 2003 ; Mutanen *et al.*, 2010). Le genre *Phyllonorycter* est très fortement représenté dans l'échantillonnage réalisé. Cependant cette forte proportion de *Phyllonorycter* représente en partie la réalité car c'est un genre regroupant environ 400 espèces (ce qui correspond à un cinquième des Gracillariidae) et qui est donc un genre dominant de cette famille (De Prins *et De Prins* 2005 ; De Prins *et De Prins*, 2009).

La distribution des caractères d' « île verte » et de « *Wolbachia* » présentent de la variabilité interspécifique mais aussi intraspécifique.

Wolbachia :

Le taux d'infection par *Wolbachia* est de 31% (42 spécimen infectés sur 135 analysés) est plutôt courant chez les insectes. Par exemple West *et al.* (1998) montrent un taux d'infection de 33.3% chez 21 espèces de lépidoptères mineurs de feuille étudiés et de 24.7% chez des espèces totales de lépidoptères. L'infection par *Wolbachia* apparaît comme assez variable d'une espèce à une autre mais on compte également des variations intraspécifiques. Ce résultat n'est pas surprenant car on sait que, bien que *Wolbachia* se transmette verticalement, c'est une bactérie capable également de transferts horizontaux (West, 1998 ; Werren *et al.*, 1995 ; Baldo *et al.*, 2006). De plus les transferts verticaux peuvent ne pas être efficaces à 100%. Les espèces et les populations peuvent donc acquérir *Wolbachia*, mais aussi perdre l'infection (Frost *et al.*, 2010). L'infection par *Wolbachia* est donc un caractère dynamique très variable d'une espèce à une autre mais également d'une population à une autre au sein d'une même espèce.

Iles vertes :

Le phénotype d'île verte est retrouvé chez 16 espèces, avec un polymorphisme intra-spécifique pour 3 d'entre elles. Bien que l'on observe différents clades au sein desquels se trouvent plusieurs espèces capables de faire des îles vertes, on ne trouve pas de groupe monophylétique clair comprenant les individus capables de former des îles vertes. Ce phénotype semble alors être apparu plusieurs fois au cours de l'évolution. Cependant, la répartition avec beaucoup de variabilité interspécifique et aussi

de la variabilité intraspécifique serait également en accord avec l'hypothèse d'un phénotype sous dépendance d'un symbionte pouvant se transmettre verticalement mais aussi horizontalement, comme le fait *Wolbachia*. Le phénotype d'île verte suivrait alors les infections bactériennes avec les différentes acquisitions et pertes possibles. Une ou plusieurs apparitions de la capacité à déclencher le phénotype d'île verte chez *Wolbachia*, se transmettant ensuite entre les clades, seraient envisageable. Cependant, il ne faut pas oublier que la plante hôte peut également jouer un rôle dans le développement du phénotype d'île verte. En effet, des larves se développant sur des plantes dont les feuilles jaunissent tard dans l'année auront plus de chance d'avoir fini leur développement larvaire au moment de la sénescence des feuilles que les individus d'une population se développant sur des plantes ayant un jaunissement des feuilles plus précoce. Les individus se trouvant sur des feuilles jaunissantes en début de développement subissent ainsi potentiellement une plus forte pression de sélection pour développer des mécanismes leur permettant de contourner la sénescence de la feuille pour achever leur développement. Cela pourrait également expliquer les variations observées, même s'il s'agit d'un caractère intrinsèque à l'insecte. Il serait intéressant d'étudier la vitesse de développement larvaire, et ainsi que les différences dans le moment de jaunissement des feuilles entre les différentes espèces de plantes hôtes afin d'intégrer les contraintes écologiques impliquées dans les différents systèmes.

La corrélation trouvée entre la présence d'îles vertes et de *Wolbachia* suggère un rôle clé de la bactérie dans le phénotype « île verte », toutefois, certaines exceptions impliquent que d'autres mécanismes doivent être envisagés.

L'analyse de corrélation effectuée sur toutes les mineuses nous permet de rejeter l'hypothèse d'indépendance des caractères *Wolbachia* et îles vertes. On peut donc dire que pour les mineuses étudiées, il y a une corrélation entre l'induction d'îles vertes et la présence de *Wolbachia*. On observe effectivement cette corrélation, chez la plupart des individus. Le rôle de *Wolbachia* dans la formation d'île verte peut donc être envisagé pour d'autres espèces que *Phyllonorycter blancardella*. Cependant, comme dans certaines espèces la corrélation est absente, on peut dire que *Wolbachia* n'est vraisemblablement pas le seul facteur impliqué dans les modifications physiologiques de la feuille conduisant à la formation d'îles vertes.

Pour les individus pour lesquels la corrélation est absente, plusieurs hypothèses sont possibles.

Influence d'autres partenaires symbiotiques L'île verte pourrait être dans certains systèmes sous la dépendance de l'insecte seul ou sous la dépendance d'un autre organisme symbiotique que *Wolbachia*. Il se peut qu'au sein d'un clade ayant été contaminé par des *Wolbachia* leur permettant

de faire des îles vertes, le rôle de la bactérie ait été repris par un autre microorganisme. En effet lors de symbioses avec co-infections, il peut arriver qu'il y ait remplacement d'une bactérie par une autre pour une certaine fonction. C'est le cas par exemple pour *Cinara cedri* (une sous espèce de *Buchnera* infectant un puceron de la sous famille des *Lachninae*) chez qui la capacité de synthèse d'un acide aminé a été perdue et est assurée par un symbiote secondaire *Serratia symbiotica* (Burke *et al.*, 2009). Puis les *Wolbachia* auraient pu être perdues secondairement. Cette hypothèse pourrait être envisagée chez *Phyllonorycter rajella*. En effet dans cette espèce, les 5 individus testés forment des îles vertes et 4 sont infectés par *Wolbachia*. Seul l'individu numéro 134 n'est pas infecté. De plus, il est intéressant de noter que cet individu est le seul de cette espèce, parmi ceux testés, à provenir de Slovénie. Il serait intéressant de tester la présence d'autres bactéries dans cette population provenant d'une origine géographique différente. Pour d'autres espèces, il semble que l'absence de corrélation soit étendue à tous les individus de l'espèce comme pour *Phyllonorycter oxyacanthae* par exemple, bien que l'échantillonnage intraspécifique soit plus réduit (deux spécimens seulement). Dans ce cas, on peut, en plus de l'hypothèse précédente, envisager de manière plus probable l'émergence du phénotype d'île verte directement chez l'insecte, ou chez un autre symbiote.

Dans les cas où la corrélation se vérifie, on observe une distribution variable de l'île verte et des *Wolbachia* avec parfois un polymorphisme intraspécifique, en opposition à de grands groupes monophylétiques formant des îles vertes issus d'une longue histoire évolutive commune.

Influence géographique/populationnelle. Chez *Phyllonorycter Comparella* par exemple, on observe trois individus infectés par *Wolbachia* capables de faire des îles vertes et 4 individus non infectés par *Wolbachia* et ne faisant pas d'île verte. Or, les individus non infectés proviennent d'Albanie, et les individus infectés capables de faire des îles vertes ont été récoltés en France et en Russie. Il semblerait donc qu'il y ait un facteur populationnel dans l'infection par *Wolbachia* et la capacité à former des îles vertes. Cette différence populationnelle peut se trouver au niveau des mineuses (différents génotypes, différentes capacités à supporter l'infection par *Wolbachia*) mais elle peut aussi être environnementale (comme le climat ou la phénologie de la plante hôte).

Influence de la plante hôte. En effet, il ne faut pas oublier que la plante hôte est un facteur non négligeable dans le phénotype d'île verte. Certaines plantes pourraient être plus réceptives à la manipulation par un organisme. Il est possible que la plante hôte ait développé une réponse et ne soit pas (ou plus) manipulable, ou encore que la capacité de l'association insecte-*Wolbachia* à former des îles vertes ait été perdue secondairement. On peut aussi penser qu'une symbiose permettant la formation des îles vertes soit plus fortement sélectionnée par les mineuses se trouvant sur des

feuilles ayant un jaunissement précoce. En effet, comme nous l'avons vu précédemment, l'écologie de la plante hôte peut ne pas nécessiter de formation d'île verte et le coût supplémentaire engendré par la l'hébergement d'un microorganisme comme *Wolbachia* pourrait, par sélection, faire disparaître le caractère. En effet *Wolbachia* est d'abord connus pour son rôle de parasite manipulateur de la reproduction et est susceptible d'avoir un coût élevé pour l'insecte. Il y aurait alors un effet de la plante hôte qui ferait varier l'équilibre de la relation mineuse-*Wolbachia* en allant soit vers l'élimination de la bactérie, soit vers une association plus durable. Cela indiquerait que l'île verte constitue bien un avantage pour la mineuse capable de contrebalancer le coût de la présence de *Wolbachia*. Cependant, au niveau intra et interspécifique, il ne semble pas y avoir d'effet de la famille de plante hôte sur la présence d'îles vertes. La comparaison des taux d'infection par *Wolbachia* des mineuses formant et ne formant pas d'îles vertes serait un argument en faveur de l'hypothèse d'un bénéfice apporté par l'île verte compensant la présence de *Wolbachia*. En effet, le taux d'infection par *Wolbachia* des mineuses formant des îles vertes est bien supérieur à celui des mineuses ne formant pas d'île verte (82.14% contre 10.53%).

5. Conclusion et perspectives

Cette étude a permis de mettre au point un protocole d'extraction d'ADN permettant de détecter la bactérie *Wolbachia* à partir d'échantillons d'adultes et de larves de microlépidoptères, avec le Microkit XS Nucleospin. Cela rend possible les analyses comparatives à grand échelle qui nécessitent un large échantillonnage avec des conditions de stockage et de collecte pouvant varier.

Elle a également permis de confirmer le barcoding comme méthode appropriée pour l'identification des lépidoptères Gracillariidae, ce qui ouvre la possibilité d'une identification à l'espèce par des non-spécialistes à partir d'échantillons larves et adultes, voire à partir de fragments d'individus.

L'étude de la relation mineuse-*Wolbachia* au niveau inter et intraspécifique est intéressante car elle nous permet de voir : premièrement, que le phénomène d'île verte pourrait être lié à la présence de *Wolbachia* dans de plusieurs espèce (11 espèces montrent la présence simultanée de formation d'île verte et de l'infection par *Wolbachia*). Deuxièmement, que d'autres facteurs permettant la formation d'île verte doivent être envisagés pour différentes espèces ou populations. En effet, 5 individus dans 4 espèces différentes ont la capacité de faire des îles vertes mais ne sont pas infectés par *Wolbachia* ce qui ouvre en particulier la question sur la capacité d'autres bactéries à former des îles vertes. Troisièmement, que le caractère d'île verte, associé à la présence de *Wolbachia*, est variable entre espèce et à l'intérieur de certaines espèces.

De nombreuses pistes peuvent être explorées sur la base des résultats obtenus. Par exemple, Il serait intéressant d'effectuer un séquençage des gènes de *Wolbachia* amplifiés afin de voir si plusieurs variants de la bactérie seraient capables d'induire des îles vertes et si des patterns de distribution des variants sont observés. Un échantillonnage de plusieurs espèces formant des îles vertes et appartenant à d'autres genres que *Phyllonorycter* (qui représente ici une grande majorité des échantillons) permettrait de voir si la corrélation *Wolbachia*-île verte reste présente de façon plus générale. Lorsque la corrélation *Wolbachia*-île verte n'est pas présente, il serait intéressant de rechercher les autres mécanismes susceptibles d'être impliqués et en particulier la présence d'autres bactéries symbiotiques. Enfin, des données sur la phénologie des plantes hôtes pourraient également être intégrées à l'étude de ces interactions *Wolbachia*-mineuses à une échelle macroévolutive afin de mieux appréhender la complexité de la relation insecte-symbionte dans son contexte écologique.

References bibliographiques

1. **M. Burstein, D. Wool and A. Eshel.** *Sink strength and clone size of sympatric, gall-forming aphids.* European journal of entomology. 91: 57-61. **1994.**
2. **M. Pagel.** *Detecting correlated evolution on phylogenies: a general method for the comparative analysis of discrete characters.* Proceedings of the Royal Society of London B. 255: 37-45. **1994.**
3. **J.H. Werren, W. Zhang, L.R. Guo.** *Evolution and Phylogeny of Wolbachia – Reproductive Parasites of Arthropods.* Proceedings of the Royal Society London B. 261: 55-63. **1995.**
4. **D.R. Davis and G.S. Robinson.** *The Tineoidea and Gracillarioidea.* In: Kristensen, N.P. (Ed.), Handbook of Zoology IV/35, Lepidoptera, Moths and Butterflies. Vol. 1. Evolution, Systematics, and Biogeography. Walter de Gruyter, Berlin, New York, pp. 91–117. **1998.**
5. **D. Posada and K.A. Crandall.** *MODELTEST: testing the model of DNA substitution.* Bioinformatics 9: 817-818. **1998.**
6. **S.A. West, J.M. Cook, J.H. Werren and C.J. Godfray.** *Wolbachia in two insect host-parasitoid communities.* Molecular Ecology. 7: 1457-1465. **1998.**
7. **J.H. Werren, D.M. Windsor.** *Wolbachia infection frequencies in insects: evidence of a global equilibrium?.* Proceedings of Biological Sciences, 267: 1277–1285. **2000.**
8. **C. Lopez-Vaamonde, H. Charles, J. Godfray, and J.M. Cook.** *Evolutionary dynamics of host-plant use in a genus of leaf-mining moths.* Evolution. 57: 1804-1821 **2003.**
9. **J.K. Moulton and B. Wiegmann.** *Evolution and phylogenetic utility of CAD (rudimentary) among Mesozoic-aged Eremoneuran Diptera (Insecta).* Molecular Phylogenetics and Evolution. 31: 363-378. **2003.**
10. **P.D.N. Hebert, E.H. Penton, J.M. Burns, D.H. Janzen and W. Hallwachs.** *Ten species in one: DNA barcoding reveals cryptic species in the neotropical skipper butterfly *Astrartes fulgerator*.* PLoS Biology. 101: 14812–14817. **2004.**
11. **G.J. Svenson and M.F. Whiting.** *Phylogeny of Mantodea based on molecular data: evolution of a charismatic predator.* Systematic Entomology. 29: 359-370. **2004.**
12. **W. De Prins and J. De Prins.** *Gracillariidae.* In: B. Landry. (Ed.) World catalogue of insects. Volume 6. Apollo Books, Stenstrup, 502 pp. **2005.**
13. **P.C. Frost, M.A. Evans-White, Z.V. Finkel, T.C. Jensen and V. Matzek.** *Are you what you eat? Physiological constraints on organismal stoichiometry in an elementally imbalanced world.* Oikos. 109: 18-28. **2005**

14. **M. Hajibabaei, J.R. deWard, N.V. Ivanova, S. Ratnasingham, R.T. Door, S.L. Kirk, P.M. Mackie, and P.D.N. Hebert.** *Critical factors for assembling a high volume of DNA barcodes.* Proceedings of the Royal Society of London B. 272: 1525–1534. **2005.**
15. **L. Baldo, J.C. Dunning Hotopp, K.A. Jolley, S.R. Bordenstein, S.A. Biber, R.R. Choudhury, C. Hayashi, M.C. J. Maiden, H. Tettelin and J.H. Werren.** *Multilocus Sequence Typing System for the Endosymbiont Wolbachia pipientis.* Applied and Environmental Microbiology. 72: 7098–7110. **2006.**
16. **D. Giron, W. Kaiser, N. Imbault and J. Casas.** *Cytokinin-mediated leaf manipulation by a leafminer caterpillar.* Biological letters. **2007.**
17. **P.L. Kwang.** *The interactive effects of protein quality and macronutrient imbalance on nutrient balancing in an insect herbivore.* The Journal of Experimental Biology. 210: 3236–3244. **2007**
18. **S. Ratnasingham and P.D.N. Hebert.** *BOLD: The Barcode of Life Data System (<http://www.barcodinglife.org>).* Molecular Ecology Notes. 7: 355–364. **2007.**
19. **M. Wiemers and K. Fiedler.** *Does the DNA barcoding gap exist? – a case study in blue butterflies (Lepidoptera: Lycaenidae).* Frontiers in Zoology. 4: 8. **2007.**
20. **J.C. Regier.** *Protocols, Concepts, and Reagents for preparing DNA sequencing templates.* Version 12/4/08. www.umbi.umd.edu/users/jcrlab/PCR_primers.pdf. **2008.** [The latest version of this document can be downloaded at www.umbi.umd.edu/users/jcrlab/PCR_primers.pdf]
21. **B.C. Schmidt and F. Sperling.** *Widespread decoupling of mtDNA variation and species integrity in Grammia tiger moths (Lepidoptera: Noctuidae).* Systematic Entomology 33: 613 – 634. **2008.**
22. **G. R. Burke, B. B. Normark, C Favret, and N. A. Moran.** *Evolution and Diversity of Facultative Symbionts from the Aphid Subfamily Lachninae.* Applied and Environmental Microbiology. 75: 5328–5335. **2009.**
23. **J. De Prins, R. Mozuraitis, C. Lopez-Vaamonde and R. Rougerie.** *Sex attractant, distribution and DNA barcodes for the Afrotropical leaf-mining moth Phyllonorycter melanosparta (Lepidoptera: Gracillariidae).* Zootaxa. 8: 53-67. **2009.**
24. **J. De Prins and W. De Prins.** *Global Taxonomic Database of Gracillariidae (Lepidoptera).* Royal Museum for Central Africa, Belgian Biodiversity Platform, Tervuren, Brussels, Belgium. Available from <http://gc.bebif.be> . **2009.**
25. **W. Grunewald, C. Van Noorden, G.V. Isterdael, T. Beeckman, G. Gheysen and U. Mathesius.** *Manipulation of Auxin Transport in Plant Roots during Rhizobium Symbiosis and Nematode Parasitism.* The Plant Cell. 21: 2553–2562. **2009.**

26. **P.D.N. Hebert, J.R. deWaard and J.F. Landry.** *DNA barcodes for 1/1000 of the animal kingdom.* Biological letters. doi: 10.1098/rsbl.2009.0848). **2009.**
27. **C. Serbielle, S. Moreau, F. Veillard, E. Voltaire, A. Bézier, M. Mannucci, A-N. Volkoff, J-M. Drezen, G. Lalmanach and E. Huguet.** *Identification of parasite-responsive cysteine proteases in *Manduca sexta*.* Biological Chemistry. 390: 493-502. **2009**
28. **R. Valade, M. Kenis, A. Hernandez, S. Augustin, N. Mari Mena, E. Magnoux, R. Rougerie, F. Lakatos, A. Roques and C. Lopez-Vaamonde.** *Mitochondrial and microsatellite DNA markers reveal a Balkan origin for the highly invasive horse-chestnut leaf miner *Cameraria ohridella* (Lepidoptera, Gracillariidae).* Molecular Ecology. 18: 3458-3470. **2009.**
29. **C.L. Frost, H. Fernandez-Marin, J.E. Smith and W.O.H. Hughes.** *Multiple gains and losses of *Wolbachia* symbionts across a tribe of fungus-growing ants.* Molecular Ecology. 19: 4077-4085. **2010.**
30. **W. Kaiser, E. Huguet, J. Casas, C. Commin and D. Giron.** *Plant green-island phenotype induced by leaf-miners is mediated by bacterial symbiont.* Proceedings of the Royal Society. 277: 2311-2319. **2010.**
31. **C. Lopez-Vaamonde, D.V.L. Agassiz, S. Augustin, J. De Prins, W. De Prins, S. Gomboc, P. Ivinskis, O. Karsholt, A. Koutroumpas, F. Koutroumpa, Z. Laštůvka, O. Karsholt, E. Marabuto, E. Olivella, L. Przybylowicz, A. Roques, N. Ryrholm, H. Šefrová, P. Šima, O. Sims, S. Sinev, R. Tomov, A. Zilli and D.C. Lees.** Lepidoptera. Chapter 11. In: Roques A et al. (Eds) *Alien terrestrial arthropods of Europe.* BioRisk 4(2): 603–668. **2010.**
32. **M. Mutanen, N. Wahlberg and L. Kaila.** *Comprehensive gene and taxon coverage elucidates radiation patterns in moths and butterflies.* Proceedings of the Royal Society London B. 277: 2839–2848. **2010.**
33. **R.J. Sinclair and L. Hughes.** *Leaf miners: The hidden herbivores.* Austral Ecology. 35: 300-313. **2010.**
34. **J.R. Langmaid, K. Sattler and C. Lopez-Vaamonde.** *Morphology and DNA barcodes show that *Calybites hauderi* (Rebel, 1906) (Lepidoptera: Gracillariidae) does not occur in the British Isles.* Nota Lepidopterologica. 2: 191-197. **2011.**
35. **P.M. Simoes, G. Mialdea, D. Reiss, M-F. Sagot and S. Charlat.** *Wolbachia detection: an assessment of standard PCR Protocols.* Molecular Ecology Resources. 11: 567-572. **2011.**
36. **A.Y. Kawahara, I. Ohshima, A. Kawakita, J.C. Regier, C. Mitter, M.P. Cummings, D.R. Davis, D.L. Wagner, J. De Prins, and C. Lopez-Vaamonde.** *Increased gene sampling provides stronger support for higher-level groups within gracillariid leaf mining moths and relatives (Lepidoptera: Gracillariidae).* BMC Evolutionary Biology. **In press.**

Annexes

5 Protocols

5.1 Standard protocol for human or animal tissue

Before starting the preparation:

- Check if Wash Buffer B5 and Proteinase K were prepared according to section 3.
- Adjust thermal heating block temperature to 56°C and equilibrate sample to room temperature (18°C-25°C).

1 Prepare sample

Place the sample of **up to 2.5 mg** into a 1.5 ml microcentrifuge tube (not provided).

For samples from 2.5 - 10 mg double the volumes of Buffer T1, Buffer B3 and ethanol in steps 2, 3, 4 to 160 µl each.

2 Pre-lyse sample

Add **80 µl Buffer T1** and **8 µl Proteinase K** solution and mix by vortexing 2 x 5 s. Be sure that the sample is completely covered with lysis solution.

If processing several samples, Proteinase K and Buffer T1 may be premixed directly before use. Do never mix Buffer T1 and Proteinase K more than 10-15 min before addition to the sample: Proteinase K tends to self-digestion in Buffer T1 without substrate.

Incubate at **56°C** until complete lysis is obtained (approximately **1-4 h** or **overnight**). Vortex occasionally during incubation or use a shaking incubator. At the end of the incubation, adjust the thermal heating block temperature to 70°C for the following step.

If RNA-free DNA is crucial for downstream applications, an RNase digest may be performed: Add 20 µl RNase A (20 mg/ml) solution (not included; see ordering information) and incubate for additional 5 min at room temperature.



+ 80 µl T1

**+ 8 µl
Proteinase K**

**56°C
1 - 4 h**

or

**56°C
overnight**

3 Lyse sample

Add **80 µl Buffer B3**, vortex 2 x 5 s and incubate at **70°C** for **5 min**. Vortex briefly at the end of the incubation.

Optional: Adjust the thermal heating block temperature to 90°C for the last step of the protocol.

Let the lysate cool down to room temperature.

A white precipitate may form in the lysate upon addition of Buffer B3, especially if very small samples are used. Precipitates will dissolve during the incubating step at 70°C.

If insoluble particles are visible after the heat incubation steps, centrifuge for 5 min at high speed (e.g. 11,000 x g) and transfer the supernatant to a new microcentrifuge tube (not provided).



+ 80 µl B3

70°C
5 min

4 Adjust DNA binding conditions

Add **80 µl ethanol (96-100%)** to the lysate and mix by vortexing 2 x 5 s.

Spin down briefly to clear the lid.



+ 80 µl
ethanol

5 Bind DNA

For each sample, place one **NucleoSpin® Tissue XS Column** into a **Collection Tube (2 ml)**. Apply the sample to the column. Centrifuge for **1 min** at **11,000 x g**. Discard the flow-through and place the column into a new Collection Tube (2 ml).

If the sample is not drawn completely through the matrix, repeat the centrifugation step at 11,000 x g.



Load lysate



1 min
11,000 x g

6 Wash silica membrane

1st wash

Add **50 µl Buffer B5** to NucleoSpin® Tissue XS Column. Centrifuge for **1 min** at **11,000 x g**. It is not necessary to discard the flow-through. Reuse the Collection Tube.



+ 50 µl B5



1 min
11,000 x g

2nd wash

Add **50 µl Buffer B5** to the NucleoSpin® Tissue XS Column. Centrifuge for **2 min** at **11,000 x g**. Discard Collection Tube with flow-through.

**+ 50 µl B5****2 min**
11,000 x g**7 Elute DNA**

Place the NucleoSpin® Tissue XS Column in a new 1.5 ml microcentrifuge tube (not provided) and apply **20 µl Buffer BE** directly onto the center of the silica membrane of the column. Centrifuge for **1 min** at **11,000 x g**.

**+ 20 µl BE**

Elution volume may be varied from approximately 5-30 µl. For a correlation of elution volume, DNA concentration and DNA amount eluted from the column see section 2.4-2.5.

**1 min**
11,000 x g**8 Optional: Remove residual ethanol**

*Incubate elution fraction with open lid for **8 min** at **90°C**.*

See section 2.5 for further comments and alternative incubation times and temperatures for a removal of residual ethanol.

**Optional:****8 min**
90°C

5 Protocol for PCR clean-up

The following protocol is suitable for PCR clean-up as well as concentration and removal of salts, enzymes, etc. from samples without SDS.

Before starting the preparation:

- Check if Wash Buffer NT3 was prepared according to section 3.

1 Adjust DNA binding condition

For sample volumes < 100 µL adjust the volume of the reaction mix to 100 µL using water.

Mix **1 volume of sample** with **2 volumes of Buffer NT** (e. g., mix 100 µL PCR reaction and 200 µL Buffer NT).

Note: For removal of DNA fragments > 65 bp, dilutions of Buffer NT can be used instead of 100 % Buffer NT. Please refer to section 2.3.



**+ 2 vol NT
per
1 vol sample**

2 Bind DNA

Place a **NucleoSpin® Extract II Column** into a Collection Tube (2 mL) and load the sample.

Centrifuge for **1 min** at **11,000 x g**. Discard flow-through and place the column back into the collection tube.



Load sample



**11,000 x g
1 min**

3 Wash silica membrane

Add **700 µL Buffer NT3** to the NucleoSpin® Extract II Column. Centrifuge for **1 min** at **11,000 x g**. Discard flow-through and place the column back into the collection tube.

Note: Carry-over of chaotropic salt may result in low A_{260}/A_{230} values. To prevent problems in very sensitive downstream applications or if the entire eluate has to be used, follow the instructions given in section 8.1 ("Suboptimal performance of DNA in sequencing, restriction, or ligation reactions - Carry-over of chaotropic salts").



+ 700 µL NT3



**11,000 x g
1 min**

4 Dry silica membrane

Centrifuge for **2 min** at **11,000 x g** to remove **Buffer NT3** completely. Make sure the spin column does not come in contact with the flow-through while removing it from the centrifuge and the collection tube.



11,000 x g
2 min

Note: Residual ethanol from Buffer NT3 might inhibit enzymatic reactions. Total removal of ethanol can be achieved by incubating the columns for 2–5 min at 70 °C prior to elution.

5 Elute DNA

Place the NucleoSpin® Extract II Column into a **new** 1.5 mL microcentrifuge tube (not provided). Add **15–50 µL Buffer NE** and incubate at **room temperature** (18–25 °C) for **1 min**. Centrifuge for **1 min** at **11,000 x g**.



+ 15–50 µL NE

RT
1 min

Note: Yield of larger fragments (>5–10 kbp) can be increased by using prewarmed elution buffer (70 °C).



11,000 x g
1 min

identifiant	Gènes de l'insecte		Gènes de <i>Wolbachia</i>	
	H3	CO1	16S	fbpa
1	non	oui	non	non
2	oui	oui	oui	non
3	oui	oui	non	non
4	oui	oui	oui	non
5	oui	oui	non	non
6	non	oui	non	non
7	non	oui	oui	non
8	oui	oui	non	non
9	oui	oui	non	non
10	oui	oui	non	oui
11	oui	oui	non	non
12	oui	oui	non	non
13	oui	oui	oui	non
14	oui	oui	oui	non
15	oui	oui	non	non
16	non	oui	oui	non
17	oui	non	oui	non
18	oui	oui	oui	non
19	oui	oui	non	?
20	oui	oui	oui	non
21	oui	oui	oui	non
22	non	non	non	?
23	non	non	non	?
24	non	non	non	?
25	oui	oui	oui	non
26	oui	oui	oui	non
27	oui	oui	oui	non
28	oui	oui	oui	non
29	oui	non	oui	non
30	oui	oui	oui	non
31	oui	oui	oui	non
32	oui	oui	non	non
33	non	oui	non	non
34	oui	oui	non	non
35	non	oui	non	non
36	non	oui	non	non
37	non	oui	non	non
38	oui	oui	non	non
39	oui	oui	non	non
40	oui	oui	non	non
41	oui	oui	non	non
42	oui	non	non	non
43	oui		non	non
44	oui		oui	non
45	oui		oui	non
46	oui		oui	non
47	oui		oui	non
48	non	oui	non	non
49	oui	oui	oui	non
50	non	oui	oui	non
51	non	oui	non	non
52	oui	oui	oui	non
53	oui	oui	oui	non
54	oui	oui	oui	non
55	oui	oui	oui	non
56	oui	non	non	non
57	oui	oui	non	non
58	oui	oui	non	non
59	oui	oui	non	non
60	oui	non	oui	non
61	oui	oui	oui	non
62	oui	oui	non	non
63	oui		non	non
64	oui		non	non
65	oui		oui	non
66	oui		oui	non
67	oui		non	non
68	oui		oui	non
69	oui		non	non
70	oui		non	non
71	oui		non	non
72	oui		non	non
73	oui		oui	non
75	oui		non	non
76	oui		non	non
77	oui		non	non
78	oui		non	non
79	oui		non	non
80	oui		non	non
81	oui		non	non
82	oui		non	non

identifiant	Gènes de l'insecte		Gènes de <i>Wolbachia</i>	
	H3	CO1	16S	fbpa
83	oui		non	non
84	oui		non	non
85	oui		non	non
86	oui		non	non
87	oui		non	non
88	non		non	non
89	oui		non	non
90	oui		non	non
91	non		non	non
92	oui		non	non
93	oui		non	non
94	non		non	non
95	oui	oui	non	non
96	oui		non	non
97	oui	oui	non	non
98	oui	oui	non	non
99	oui	oui	non	non
100	oui	oui	non	non
101	oui	oui	non	non
102	oui	oui	non	non
103	oui	oui	oui	non
104	oui	oui	non	non
105	oui	oui	non	non
106	oui	oui	non	non
107	oui	oui	non	non
108	oui	oui	non	non
109	oui	oui	non	non
110	oui	oui	non	non
111	oui	oui	non	non
112	oui	oui	non	?
113	oui	oui	non	non
114	oui	oui	non	non
115	oui	oui	non	non
116	oui		oui	non
117	oui		non	non
118	oui		non	non
119	oui		non	non
120	oui		non	?
121	oui		non	non
122	oui	oui	non	non
123	oui	oui	non	non
124	oui	oui	non	non
125	oui	oui	oui	non
126	oui	oui	oui	non
127	oui	oui	oui	non
128	oui	oui	non	non
129	oui	oui	oui	non
130	oui	oui	oui	non
131	oui	oui	non	non
132	oui	oui	non	non
133	oui	oui	non	non
134	oui	oui	non	non
135	oui	oui	non	non
136	oui	oui	oui	non
137	oui	oui	non	non
138	oui	oui	non	non
139	oui	oui	non	non
140	oui	oui	non	non
141	oui	oui	oui	non
142	oui	oui	non	non
143	oui	oui	oui	non
144	oui	oui	oui	non
145	oui	oui	oui	non
146	oui	oui	oui	non
147	oui	oui	non	non
148	oui	oui	non	non
149	oui	oui	non	non
150	oui	oui	oui	non
151	oui	oui	oui	non
152	oui	oui	oui	non
153	oui	oui	oui	non
154	oui	oui	non	non
155	non	oui	non	non
156	oui	oui	non	non
157	oui	oui	non	oui
158	oui	oui	non	non
159	oui	oui	non	non
160	oui	oui	non	non
161	oui	oui	oui	non
162	oui	oui	non	non
163	oui	oui	non	non

Annexe 3. Tableau des résultats des amplifications par PCR. Une case vide signifie que la PCR n'a pas été effectuée. Elles correspondent pour le CO1 aux individus dont les séquences de barcode étaient déjà connues. Pour le gène FbpA, elles correspondent aux échantillons à partir desquels le gène 16S a été amplifié.

identifiant	Gènes de l'insecte	
	Histone	CO1
1		
2	oui	oui
3	oui	oui
4	oui	
5	oui	oui
6		oui
7		
8	oui	oui
9	oui	oui
10	oui	oui
11	oui	oui
12	oui	oui
13	oui	oui
14	oui	oui
15	oui	
16		
17	oui	non
18	oui	Wolbachia
19	oui	oui
20	oui	oui
21	oui	non
22		
23		
24		
25	oui	parasitoïde
26	oui	non
27	oui	
28	oui	oui
29		
30	oui	oui
31	oui	oui
32	oui	oui
33		
34	oui	oui
35		oui
36		oui
37		oui
38	oui	oui
39	oui	oui
40	oui	oui
41	non	
42	oui	
43	oui	
44	oui	
45	oui	
46	oui	
47	oui	
48		oui
49	non	oui
50		oui
51		oui
52	oui	oui
53	oui	oui
54	oui	oui
55	oui	oui
56	oui	
57	non	oui
58	oui	oui
59	oui	oui
60	non	
61	oui	oui
62	oui	oui
63	oui	
64	oui	
65	oui	
66	oui	
67	oui	
68	oui	
69	oui	
70	oui	
71	oui	
72	oui	
73	oui	
75	oui	
76	oui	
77	oui	
78	non	
79	oui	
80	oui	
81	oui	
82	oui	

identifiant	Gènes de l'insecte	
	Histone	CO1
83	oui	
84	oui	
85	oui	
86	oui	
87	oui	
88		
89	oui	
90	oui	
91		
92	oui	
93	oui	
94		
95	oui	oui
96	oui	
97	oui	oui
98	oui	oui
99	oui	oui
100	non	oui
101	oui	oui
102	oui	oui
103	oui	
104	oui	oui
105	oui	oui
106	oui	
107	oui	oui
108	oui	oui
109	oui	oui
110	oui	oui
111	oui	oui
112	non	
113	oui	oui
114	non	non
115	non	oui
116	oui	
117	oui	
118	oui	
119	oui	
120	oui	
121	oui	
122	oui	oui
123	oui	oui
124	oui	oui
125	oui	oui
126	oui	oui
127	oui	oui
128	oui	oui
129	oui	oui
130	oui	oui
131	oui	oui
132	oui	oui
133	oui	oui
134	oui	oui
135	oui	
136	oui	oui
137	non	oui
138	oui	oui
139	oui	oui
140	oui	
141	oui	oui
142	oui	oui
143	oui	oui
144	oui	oui
145	oui	oui
146	oui	oui
147	non	oui
148	non	oui
149	oui	oui
150	oui	oui
151	oui	oui
152	oui	oui
153	oui	oui
154	oui	oui
155		oui
156	oui	oui
157	oui	oui
158	oui	oui
159	oui	oui
160	oui	oui
161	oui	oui
162	oui	oui
163		oui

Annexe 4. Résultat des séquençage pour les différents échantillons. Une case vide signifie que le séquençage n'a pas été effectué.

Résumé

Beaucoup d'organismes sont confrontés à un déséquilibre des ressources nutritives, ce ne permettent pas de couvrir les besoins énergétiques nécessaires à une fitness optimale. Parmi les réponses possibles à ce déséquilibre alimentaire, certains consommateurs primaires ont développé la capacité de manipuler les végétaux pour optimiser les apports énergétiques. Chez les lépidoptères mineurs de feuilles, par exemple, certaines espèces maintiennent la zone minée verte durant le jaunissement du reste de la feuille donnant ainsi naissance à un phénotype qualifié « d'île verte ». Chez *Phyllonorycter blancardella*, la bactérie *Wolbachia* semble jouer un rôle prépondérant dans l'induction de ce phénomène. Ce stage consiste en l'étude de cette relation intime plante-insecte-endosymbionte, à un niveau macroévolutif. Les objectifs de ce stage sont : 1) de développer un protocole permettant de détecter *Wolbachia* à partir de quantités très faibles de tissus (larves de microlépidoptères); 2) de tester la validité du « DNA barcoding » comme outil pour identifier, au niveau de l'espèce, différents stades de Gracillariidae et d'évaluer l'étendue de l'association *Wolbachia*/mineuses de feuilles/île verte, en investiguant la présence de *Wolbachia* et des îles vertes pour 162 microlépidoptères dont 142 Gracillariidae.

L'ADN des 162 échantillons a été extrait, puis un gène mitochondriale (COI) et un gène nucléaire de l'insecte (histone 3) ont été amplifiés puis séquencés et la présence de *Wolbachia* a été détectée par amplification du gène 16S et FbpA. La phylogénie des mineuses a été faite à partir des deux gènes de l'insecte combinés par la méthode de maximum de vraisemblance. La distribution de *Wolbachia* et du phénotype « île verte » a pu être étudiée sur 134 individus et la corrélation entre les deux caractères a été réalisée sur 106 individus.

La mise au point d'une méthode d'extraction d'ADN pour des individus larve et adulte ouvre de nouvelles perspectives en terme de screening intensif à l'échelle intra et interspécifique. De plus, l'efficacité de l'utilisation du barcoding pour identifier les espèces de Gracillariidae a été confirmée. De la variabilité dans la distribution des caractères d' « île verte » et de « *Wolbachia* » a pu être observé au niveau intra et interspécifique. La corrélation entre la présence d'îles vertes et de *Wolbachia* a pu être validée. On peut donc envisager un rôle clé de la bactérie dans le phénotype « île verte » chez plusieurs espèces. Cependant, certains individus forment des îles vertes mais, d'après les tests fiables, ne sont pas infectés par *Wolbachia* suggérant que d'autres mécanismes doivent être envisagés.

Ce stage permet d'ouvrir de nombreuses perspectives dans l'étude des mécanismes de manipulation de la plante hôte et de la relation symbiotique mineuse/*Wolbachia* qui y est associée.

Abstract

Many organisms have to face unbalanced food source, in term of energy and relative quantity of nutrients, which can be deleterious for the organism's fitness. Among a wide range of existing strategies, some herbivores have developed the ability to manipulate plants in order to improve their nutritional value. In leaf-minning moths, for example, some species are able to keep the mined area green the plant withdraws nutrients (usually in the autumn), leading to a phenomenon called "green island". In *Phyllonorycter blancardella*, the *Wolbachia* bacterial endosymbiont appears to play an important role in the formation of this phenotype.

Here I use a molecular phylogenetic approach to study the macroevolutionary interactions between leaf-mining moths, their host plants (green islands) and their associated *Wolbachia*. The aims of this study are: 1) to optimize DNA extraction protocol that allows gene amplification for both insect and *Wolbachia* from small amounts of tissue (such as microlépidoptera larvae); 2) to test the validity of DNA barcoding as a valuable method to identify Gracillariidae species and 3) to evaluate how widespread the *Wolbachia*/leafminer/green island relation is by screening the presence of green islands and *Wolbachia* in 162 microlépidoptera including 142 leaf-mining Gracillariidae micromoth.

DNA was extracted and one mitochondrial (CO1) and a nuclear gene fragments (histone 3) was amplified. *Wolbachia* infection was detected by the amplification of the 16S and FbpA genes. The phylogeny of leaf-mining moths was inferred from a concatenated matrix using the maximum likelihood approach. The distribution of both *Wolbachia* and green islands based on 134 specimens was mapped on the leaf-mining moth phylogeny on which their evolutionary development was optimized, while the correlation between both characters was tested on 106 specimens.

The elaboration of a DNA extraction protocol that allows the extraction of *Wolbachia* DNA from tiny amounts of tissue, such as early larval stages of Gracillariidae micromoths opens the possibility of screening many more species using larvae (without the need to rear the adult moths) and as is the case in the vast majority of Lepidoptera DNA barcoding was confirmed as a valuable identification method for Gracillariidae species, in particular allowing the unambiguous matching of larval stages.

Intra and interspecific variability was observed for the distribution of both the green island phenotype and *Wolbachia* infection. Significant correlation was found between the evolution of both characters, so *Wolbachia* is likely to have played an important role in the evolution of green island phenotype, not only in *P. blancardella* but in leaf-mining moths in general and Gracillariidae micromoths in particular. However, according to the high reliability of our PCR assay, some individuals are able to make green islands without being infected by *Wolbachia*, which means that other mechanisms have to be considered.

This study opens new perspectives for the understanding of the mechanisms underlying host plant manipulation by endophagous insects and the *Wolbachia*/leafminer interactions.