



HAL
open science

Caractérisation moléculaire et morphologique des punaises d'intérêt agronomique (genres *Eurydema* et *Lygus*)

Guénaëlle Genson

► **To cite this version:**

Guénaëlle Genson. Caractérisation moléculaire et morphologique des punaises d'intérêt agronomique (genres *Eurydema* et *Lygus*). Systématique, phylogénie et taxonomie. 2020. hal-03050519

HAL Id: hal-03050519

<https://ephe.hal.science/hal-03050519>

Submitted on 10 Dec 2020

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

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



École Pratique
des Hautes Études

PSL 

INRAE

MINISTÈRE DE L'ENSEIGNEMENT SUPÉRIEUR ET DE LA RECHERCHE

ÉCOLE PRATIQUE DES HAUTES ÉTUDES

Sciences de la Vie et de la Terre

MEMOIRE

Présenté

Par

GENSON Guénaëlle

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

Caractérisation Moléculaire et Morphologique des punaises d'intérêt agronomique (genres *Eurydema* et *Lygus*)

Soutenu le 2 décembre 2020 devant le jury suivant :

Sébastien COUETTE	–	Président
Jean-Claude STREITO	–	Tuteur Scientifique
Claudine MONTGELARD	–	Tutrice Pédagogique
David OUVRARD	–	Rapporteur
François DUSOULIER	–	Examineur
Benjamin GARD	–	Examineur

Mémoire préparé sous la direction de :

Dr Claudine Montgelard
Centre d'Ecologie Fonctionnelle et Evolutive
UMR 5175 CNRS/UMI, II et III/Cirad/SupAgro
1919 route de Mende
34293 Montpellier Cedex 5

IR Jean-Claude Streito
Centre de Biologie pour la Gestion des Populations
UMR 1062 INRAe/IRD/Cirad/SupAgro
755 avenue du campus Agropolis
34988 Montferrier-sur-Lez Cedex

REMERCIEMENTS

Après bientôt trois ans, ce diplôme arrive à sa fin et il est temps pour moi de remercier toutes les personnes qui ont contribué de près ou de loin à ce travail et qui m'ont soutenue aussi bien moralement que professionnellement.

Mes premières pensées vont vers mon tuteur scientifique et chef « d'équipe » Jean-Claude Streito pour m'avoir permis de réaliser ce projet en me libérant du temps au maximum malgré les contraintes fortes. Il m'a été d'une grande aide aussi bien pour les analyses que pour la rédaction du mémoire. C'est un réel plaisir de travailler sous sa direction. Jean-Claude, tu m'as fait découvrir le monde insoupçonné des insectes et notamment des punaises et j'ai réussi finalement à les trouver jolies, même si elles m'ont posé de sérieux problèmes !

Je tiens à remercier Claudine Montgelard d'avoir accepté de superviser mon travail en tant que tutrice pédagogique. Elle a su me guider et me conseiller pendant ces trois ans pour la rédaction du mémoire et pour le suivi rigoureux de ce projet. Elle a toujours été disponible pour moi et pour toutes les questions concernant l'EPHE et notamment vers la fin où trouver un rapporteur commençait à devenir un parcours du combattant !!

J'aimerais remercier David Ouvrard qui a accepté d'être rapporteur à la dernière minute et François Dusoulier et Benjamin Gard en tant qu'examineurs pour avoir accepté de juger ce travail. Un grand merci à Sébastien Couette d'avoir accepté de présider le jury et de m'avoir aidée quand je me suis heurtée à R lors de mes études morphométriques, merci pour sa patience ! Merci pour l'intérêt porté à mon travail et pour la lecture du manuscrit.

Un grand merci à Astrid Cruaud pour sa disponibilité pendant la formation en phylogénie multilocus, ses pipelines..., pour tous ses conseils et ses explications notamment pour le RADseq, ainsi qu'à Jean-Yves Rasplus qui a été mon responsable pendant les 26 premières années de ma carrière à l'INRA. C'est lui qui m'a recruté !

Merci également à la direction du CBGP, à toi, Flavie qui lutte tous les jours et m'a encouragée dans mon projet de continuer mes études, à toi, Laurent pour avoir eu la patience de lire et relire mon mémoire. Et ensuite à Renaud et Carine qui m'ont accordé beaucoup d'attention. Merci à vous.

Ce diplôme faisant partie intégrante d'un projet de recherche, il m'a permis d'interagir avec de nombreux étudiants qui ont eu tous un rôle dans sa réalisation. Merci à Maëva Sorel pour toute son aide au niveau des *Eurydema* et Jérémie Fandos pour toute l'aide apportée au niveau de l'étude des *Adelphocoris*. Mais également à tous les collaborateurs du projet, Prisca Pierre Sandra ...

Je tiens à remercier également pour sa gentillesse Armand Matocq qui a accepté de consacrer du temps de sa retraite bien méritée pour se prêter au jeu d'identification et reconnaissance à l'aveugle de certains échantillons de *Lygus*. Merci également pour tous les conseils et ses connaissances sur ce genre de punaises pas facile.

Merci beaucoup à toutes les personnes du plateau BM, Laure S, laure B, Anne laure, Caro, Anne, Max, Sabine, Johannes, Amandine, Philippe qui m'ont soutenue et encouragée. Un immense Merci à Samira pour les parties de fous rires avec Jean-Marc et le collègue d'administration tout au long de cette formation, et les parties de baby-foot du midi. Ma lettre serait incomplète si j'oubliais Éric et Emma qui sont les garants des insectes bien rangés !! Ainsi que Sylvain et Franck pour les conseils sur R et la bio-informatique et Laurent pour Photoshop. Merci à toutes les personnes du CBGP !

Merci également à mes amis Jeff, Corinne, Marjorie, Patrick, Dania, David, Lola, Solange, Bernard et Sacha qui m'ont apporté une aide précieuse pour toutes les sorties « Punaises !! Change-toi les idées, ne reste pas avec tes punaises !!».

Une dédicace spéciale à toi, Patrick, d'avoir su être patient et d'être tout simplement là.

Merci à la formation permanente INRAe et au CBGP de m'avoir permis de financer cette formation et à l'EPHE pour la qualité de ses enseignements.

Un grand merci à ma mère, mes sœurs pour leur soutien et leur encouragement et plus particulièrement à mes fils Gaël et Lilian dont je suis très fière qui m'ont soutenue et encouragée au quotidien. Eux aussi sont dans les études supérieures !!

ECOLE PRATIQUE DES HAUTES ETUDES

Science de la vie et de la terre

Caractérisation moléculaire et morphologique des punaises d'intérêt agronomique (genres *Eurydema* et *Lygus*)

Guénaëlle GENSON

Soutenu le 02 décembre 2020

RESUME

Du fait de la montée en puissance de l'agriculture biologique, et de la politique agricole préconisant de réduire l'usage d'insecticides et autres pesticides, les dégâts occasionnés par les punaises phytophages sont en augmentation depuis une dizaine d'années et peuvent conduire à des pertes importantes de production en cultures légumières sous abri. Dans le même temps, il est apparu que la connaissance sur la caractérisation, la biologie et le comportement en culture de plusieurs espèces de punaises phytophages étaient encore à améliorer pour permettre de mettre au point des stratégies globales de protection. Mon travail s'inscrit dans ce cadre et s'intègre dans une approche de gestion de l'agriculture durable et concerne plus particulièrement la caractérisation des espèces de deux genres de punaises ravageuses de cultures légumières composant les deux parties du mémoire ; le genre *Eurydema* qui est uniquement ravageur de crucifères et connu sous le nom de « punaises des choux », et le genre *Lygus*, polyphage. Plusieurs approches vont être abordées dans une démarche de taxinomie intégrative pour répondre aux questions d'identification.

Pour le genre *Eurydema*, l'identification morphologique semble satisfaisante mais l'utilisation du « barcoding » code-barres standard avec le fragment du gène COI (658pb) a révélé des complexes d'espèces insoupçonnés notamment *Eurydema dominulus* (Scopoli, 1763) / *Eurydema cyanea* (Fieber, 1864), mais aussi de nouveaux clades géographiques chez *Eurydema ornata* (Linnaeus, 1758), trois espèces sur lesquelles mon travail sera focalisé. L'emploi de plusieurs autres marqueurs moléculaires Cytb, 28S et ITS permet de confirmer les résultats trouvés sur le COI. L'utilisation de l'approche morphométrique géométrique par la méthode Procruste au niveau de ces trois espèces est une technique à approfondir car peu de spécimens ont été testés.

La caractérisation morphologique des espèces du genre *Lygus* est complexe et le « barcoding » se montre insuffisant pour résoudre l'identification. L'ajout de gènes supplémentaires (Cytb, ND5, 28S et ITS) n'apporte pas d'amélioration significative. Seule l'espèce *L. rugulipennis* se sépare des autres espèces européennes et se révèle plus proche des taxons américains. La morphométrie géométrique de contour met en évidence la variabilité saisonnière chez les *Lygus* souvent énoncée dans la littérature mais jamais démontrée jusqu'à ce jour mais ne permet pas, non plus, de distinguer les espèces. L'apport du RADseq renforce l'idée que plusieurs espèces devraient être mises en synonymie.

Cette démarche de taxinomie intégrative avec l'utilisation combinée de techniques de biologie moléculaire, de caractères morphologiques et de morphométrie géométrique permet de conclure sur deux synonymies d'espèces dans le genre *Lygus* et donner des pistes de recherche d'identification pour explorer les complexes d'espèces présents dans le genre *Eurydema*.

MOTS CLES : Barcoding, *Eurydema*, *Lygus*, morphométrie géométrique, RADseq, cultures légumières, variabilité saisonnière, taxinomie intégrative.

TABLE DES MATIERES

Abréviations	9
Liste des Figures	11
Liste des Tableaux	14
Introduction	15
1. Problématique punaises en cultures légumières : les espèces impliquées	16
2. L'identification des <i>Eurydema</i> et des <i>Lygus</i> : une entreprise compliquée	17
Le genre <i>Eurydema</i>	17
Le genre <i>Lygus</i>	17
3. Objectifs du diplôme	18
Chapitre I : Généralités	20
A/-Définitions : Systématique, Taxinomie, Taxinomie intégrative	20
1- Systématique ou taxinomie ?	20
1-1 Qu'est-ce que la taxinomie?	20
1-2 Qu'est-ce qu'une espèce ?	21
2- Comment délimiter des espèces : les différents caractères utilisés	23
2-1 Critère morphologique	23
2-2 Critères moléculaires : « barcoding » et le « barcoding gap »	23
3- Concept et critères d'espèce	25
3-1 Critère phylogénétique	25
3-2 Critère écologique	25
3-3 Autre critère : le comportement	26
3-4 Critère d'interfécondité et critère d'interstérilité	27
4- Taxinomie intégrative	27
B/-Les modèles d'études : les Punaises	28
1- Qu'est-ce qu'une punaise?	28
2- Phylogénie et Classification des punaises	28
Le genre <i>Eurydema</i>	30
Le genre <i>Lygus</i>	31
C/ Matériel et Méthodes	31
1- Matériel Biologique	32

2-	Études morphologiques	32
3-	Études morphométriques	34
4-	Méthodes moléculaires	38
Chapitre II : Modèle Biologique n°1		47
A/	Contexte général : Le genre <i>Eurydema</i>	47
1-	Définition et diversité du genre <i>Eurydema</i>	47
2-	Spécificités d'hôtes et de niches écologiques des <i>Eurydema</i>	48
3-	Importance agronomique du genre <i>Eurydema</i>	51
4-	Cycle biologique du genre <i>Eurydema</i>	52
5-	Critères morphologiques et difficultés d'identification des espèces d' <i>Eurydema</i>	53
B/	Matériel et méthodes	55
1-	Matériel étudié	55
2-	Recherches de marqueurs moléculaires	56
3-	Méthodes morphologiques et morphométriques	57
C/	Résultats	57
1-	Echantillonnage	57
2-	Résultats moléculaires	58
	2.1. Barcoding	58
	2.2. Cas des deux clades de <i>E. ornata</i>	63
	2.3. Cas du complexe <i>E. dominulus/E. cyanea</i>	65
D/	Interprétation et discussion	67
Chapitre III : Modèle Biologique n°2		76
A/	Contexte général : Le genre <i>Lygus</i>	76
1-	Définition et diversité du genre <i>Lygus</i>	76
2-	Importance agronomique du genre <i>Lygus</i>	78
3-	Biologie et Cycle biologique du genre <i>Lygus</i>	79
4-	Variations morphologiques saisonnières dans le genre <i>Lygus</i>	80
5-	Taxinomie des espèces ouest-européennes du genre <i>Lygus</i>	81
6-	Identification morphologique des <i>Lygus</i> d'Europe de l'Ouest	82
7-	Caractères morphologiques utilisés pour identifier les 7 espèces de <i>Lygus</i> ouest-européennes.	83
8-	Identification moléculaire des espèces du genre <i>Lygus</i>	90
9-	Rappel des objectifs de l'étude : pourquoi et comment revoir la discrimination des espèces de <i>Lygus</i> d'Europe de l'Ouest?	91

B/ Matériel et méthode	93
1- Matériel étudié	93
2- Identification morphologique des échantillons et vérification de la pertinence des caractères morphologiques utilisés pour identifier les <i>Lygus</i> d'Europe de l'Ouest	94
3- Recherche de marqueurs moléculaires	95
4- Essai d'identification morphométrique	99
C/ Résultats	102
1- Résultats morphologiques	102
2- Résultats moléculaires	104
2-1-Barcodeing	104
2-2 Autres gènes mitochondriaux analysés	107
2-3 Concaténation des gènes mitochondriaux	110
2-4 Autres gènes nucléaires	111
2-5 Concaténation des gènes nucléaires	113
2-6 Concaténation de l'ensemble des gènes	117
3- Résultats du RADseq	118
4- Résultats morphométriques	120
4-1 Analyse des points homologues	120
4-2. Analyse du contour	121
5- Conclusion	123
D/ Interprétation et Discussion	123
1- Identifications à l'aveugle et morphométrie	123
2- Résultats moléculaires	125
Conclusion et Perspectives	136
Bibliographie	139
De A à F	141
De G à Mi	144
De Mo à Sk	146
De Sl à Z	149

Annexes

Annexe 1 : <i>Eurydema</i>	150
Annexe 2 : <i>Lygus</i>	155
Annexe 3 : Protocole Adobe Photoshop	159
Annexe 4 : Script R « points homologues »	160
Annexe 5 : Script R « Analyse de contour »	162
Annexe 6 : <i>Eurydema</i> Arbres phylogénétiques en NJ	165
Annexe 7 : <i>Lygus</i> Reconnaissance à l'aveugle	169
Annexe 8 : Modèles d'évolution	170
Annexe 9 : <i>Lygus</i> Arbres phylogénétiques en ML	172
Annexe 10 : <i>Lygus</i> Arbres phylogénétiques en NJ	176
Annexe 11 : Matrices de distances	182
Annexe 12 : Réseaux d'haplotypes	185
Annexe 13 : Clé d'identification des espèces de <i>Lygus</i>	190
Annexe 14 : Photos des spécimens de <i>Lygus</i> du tableau 14	191

Abréviations

3D	Trois dimensions
A + T	Zone riche en Adénine et Thymine de l'ADN mitochondrial
ACP	Analyse en Composantes Principales
ADN	Acide Désoxyribonucléique
ADNmt	Acide Désoxyribonucléique mitochondrial
AN	Afrique du Nord
ARNr	Acide Ribonucléique ribosomique
AS	Asie
ATP8	ATP synthétase subunit 8
BLAST	Basic Local Alignment Search Tool
BOL	Barcoding of Life
BOLD	Barcoding of Life Data system
BP	Boostrap
BR	Fragment amplifié de la Cytochrome Oxydase I
CASDAR	Caisse d'Affectation Spéciale Développement Agricole et Rural
CBGP	Centre de Biologie pour la Gestion des Populations
CIPRES	Cyberinfrastructure for Phylogenetic Research
COI	Gène de la Cytochrome Oxydase I
CO2	Gène de la Cytochrome Oxydase 2
CO3	Gène de la Cytochrome Oxydase 3
CTIFL	Centre Technique Interprofessionnel des Fruits et Légumes
Cytb	Gène du Cytochrome b
dNTP	Désoxyribonucléotides Tri-Phosphate
EPHE	Ecole Pratique des Hautes Etudes
EU	Europe
F	Forward
FC	Fragment amplifié de la Cytochrome Oxydase I
i	Index
IMPULsE	Développement et Intégration de Méthodes innovantes pour la maîtrise des PUnaises en cultures LÉgumières

INRAe	Institut National de la Recherche pour l'Agriculture, l'alimentation et l'environnement
ITS	Gène des espaceurs internes transcrits
K2P	Kimura's two parameter
MgCl ₂	Chlorure de Magnésium
MJN	Median Joining Network
ML	Maximum de Vraisemblance
MNHN	Museum National d'Histoire Naturelle
NCBI	National Center for Biotechnology Information
ND2	Gène de la NADH déhydrogénase 2
ND5	Gène du NADH-ubiquinone oxidoreductase chain 5
NGS	Nouvelle Génération de Séquençage
NJ	Neighbour Joining
Nov. Syn.	Nouvelle Synonymie
OEPP	Organisation Européenne et Méditerranéenne pour la Protection des Plantes
pb	Paire de bases
PCR	Polymerase Chain Reaction
QBoL	Development of a new diagnostic tool using DNA barcoding to identify quarantine organisms in support of plant health
Q-PCR	PCR quantitative
R	Reverse
RADseq	Restriction site Associated DNA sequencing
SNP	Single nucleotide polymorphism
U	Unité

Liste des figures

Figure 1 : Représentation de l'espèce et de son devenir au cours du temps d'après une illustration de Samadi et Barberousse (2006).

Figure 2 : Représentation du « Barcoding gap » (Elias et Condamine, 2014)

Figure 3 : Descendants fertiles vs descendants stériles.

Figure 4 : Illustration des principaux critères pour définir une punaise. Photographie d'un *Eurydema* effectuée par J.C. Streito.

Figure 5 : Arbre phylogénétique des Hémiptères illustrant les principales unités taxonomiques des modèles étudiés. Figure modifiée à partir de Li et al., 2017.

Figure 6 : Illustration des caractères permettant de caractériser la famille des Pentatomidae.

Figure 7 : Illustration des critères permettant de décrire la famille des Miridae.

Figure 8 : Illustration de la conservation des pièces génitales et des échantillons.

Figure 9 : Les étapes de la superposition Procruste.

Figure 10 : Exemples de somme de signaux sinusoïdaux de périodes différentes permettant l'obtention d'un signal.

Figure 11 : Décomposition d'un signal en trois harmoniques et somme de celles-ci. Approximation d'un contour réel par ajouts successifs d'harmoniques de longueur d'onde décroissante, dans le cas d'un traitement séparé des coordonnées cartésiennes X et Y.

Figure 12 : Illustration de l'approche two-step PCR (Cruaud et al., 2017).

Figure 13 : Découpage du fragment d'intérêt COI en deux fragments.

Figure 14 : Planche 1 : Illustration des différentes espèces d'*Eurydema* étudiées (Photos J.C. Streito).

Figure 15 : Photo illustrant les dégâts d'*Eurydema* sur choux (J.C. Streito).

Figure 16 : Illustration des pièces génitales chez *E. dominulus*.

Figure 17 : Illustration des emplacements des points homologues sur les échantillons d'*Eurydema*.

Figure 18 : Arbre phylogénétique reconstruit à partir des séquences COI en ML avec 1000 réplifications de bootstrap.

Figure 19 : Arbre phylogénétique reconstruit à partir des séquences concaténées des espèces ciblées *E. ornata*, *E. dominulus* et *E. cyanea* en NJ avec 1000 réplifications de bootstrap.

Figure 20 : Représentation graphique donnée par le script R après utilisation des packages « stereomorph », « geomorph » et « shiny ».

Figure 21 : Illustration de différents paramères gauches et droits d'*E. dominulus* et *E. cyanea* ainsi que trois spermathèques femelles d'*E. cyanea* et *E. dominulus*.

Figure 22 : Photographie effectuée par Jean-Claude Streito lors d'une mission. Accouplement naturel entre un individu *E. dominulus* et un individu *E. cyanea*.

Figure 23 : Photographie de l'échantillon hybride *cyanea/dominulus* JSTR08062_0101.

Figure 24 : Schéma des principaux caractères morphologiques utilisés pour décrire les espèces du genre *Lygus*. (a) représentation d'une patte. (b) Face dorsale. (c) Face latérale. (d) représentation de la tête vue de face. (Extrait de Mueller et al., 2003).

Figure 25: Caractères de reconnaissance des *Lygus* dans un champ.

Figure 26 : Exemple de dégâts de *Lygus* sur bouton floraux d'aubergine (J.C. Streito).

Figure 27 : Cycle de développement d'une génération de *Lygus rugulipennis*.
<http://ephytia.inra.fr/fr/C/19730/Biocontrol-Biologie>

Figure 28 : Ponctuation des espèces *L. rugulipennis*, *L. pratensis*, *L. punctatus* et *L. gemellatus*.

Figure 29 : Ponctuation des pronotums des 7 espèces étudiées du genre *Lygus*.

Figure 30 : Illustration de la différence de pilosité chez *L. gemellatus* et *L. rugulipennis*.

Figure 31 : Représentation des différentes eunomies du scutellum chez 7 espèces de *Lygus*.

Figure 32 : Illustration de la présence ou absence de tache à l'apex du cuneus en fonction des espèces.

Figure 33 : Représentation de la variation de coloration chez *L. punctatus*, *L. italicus*, *L. gemellatus* et *L. maritimus*.

Figure 34 : Critère de la tache noire sur le tylus des espèces *L. italicus*, *L. maritimus* et *L. gemellatus*.

Figure 35 : Représentation d'un pygophore mâle.

Figure 36 : Illustration de quelques paramères gauches pour une comparaison avec la clé existante en haut à gauche de Wagner et Weber (1964).

Figure 37 : Illustration de paramères droits sur 6 espèces françaises.

Figure 38 : Illustration d'un pénis et des différents éléments utilisés en taxinomie des *Lygus*.

Figure 39 : Différence de longueur et variabilité des spicules en fonction des individus et en fonction des différentes espèces de *Lygus*.

Figure 40 : Illustration des genitalia femelles.

Figure 41 : Illustration des anneaux sclérifiés faite par Aglyamzyanov (2006) pour les espèces.

Figure 42 : Exemple d'échantillons comportant plusieurs identifications différentes effectuées par des taxonomistes différents (collection J.C. Streito).

Figure 43 : Exemples de photographies inexploitable pour la morphométrie.

Figure 44 : Schéma des étapes de la préparation de la librairie RADSeq.

Figure 45 : Schéma d'un démultiplexage des séquences issu du tutoriel de Stacks.

Figure 46 : Schéma d'une construction de listes de loci disponibles et des liens qui existent entre ces loci (extrait du tutoriel de Stacks).

Figure 47 : a) Illustration de la position des différents points homologues pour l'étude procruste. b) en vert, position des 4 points rajoutés au niveau de la tête et du pronotum.

Figure 48 : Exemple de photo de pronotum mis en noir et blanc avant analyse des contours.

Figure 49 : Illustration d'une décomposition de la forme en ellipse.

Figure 50 : Illustration du nombre d'harmoniques nécessaires pour reconstituer la forme.

Figure 51 : Arbre phylogénétique reconstruit à partir des séquences COI sur les échantillons mâles en ML sous CIPRES avec 1000 réplication de bootstrap.

Figure 52 : Réseau d'haplotypes effectué sur 84 séquences COI.

Figure 53 : Arbre phylogénétique reconstruit avec les séquences mitochondriales concaténées (1836 pb) sous CIPRES en ML avec 1000 réplications de bootstrap.

Figure 54 : Réseau d'haplotypes effectué sur 84 séquences mitochondriales concaténées.

Figure 55 : Réseau d'haplotypes construit à partir des séquences 28S de la littérature couplées à celles de notre étude.

Figure 56 : Arbre phylogénétique reconstruit à partir des séquences concaténées de l'ensemble des gènes nucléaires sous CIPRES en ML avec 1000 réplications de bootstrap.

Figure 57 : Réseau d'haplotypes effectué sur l'ensemble des séquences nucléaires concaténées sur 53 échantillons de *Lygus*.

Figure 58 : Arbre phylogénétique reconstruit à partir de l'ensemble des séquences concaténées (3604pb) sous CIPRES en ML avec 1000 réplications de bootstrap.

Figure 59 : Réseau d'haplotypes effectué sur 42 échantillons de *Lygus*.

Figure 60 : Arbre reconstruit en ML sous RaxML sur l'ensemble des loci déterminés variables après traitement bio-informatique RADIS M2n10S8L100.

Figure 61 : Représentation des coordonnées de chaque échantillon répété deux fois selon une analyse procrustéenne généralisée à partir de 19 points homologues.

Figure 62 : Représentation des coordonnées de chaque échantillon répété deux fois mis par groupe selon une analyse procrustéenne généralisée à partir de 19 points homologues.

Figure 63 : Graphe représentant la disparité de la morphologie du pronotum en fonction des différentes espèces.

Figure 64 : Graphe représentant la distribution de la morphologie de contour dans le groupe A (insectes sortant de diapause).

Figure 65 : Graphe représentant la distribution des morphologies de contour des espèces du groupe B (insectes de la génération de "l'année" en cours).

Liste des tableaux

Tableau 1 : Liste des séquences des amorces utilisées pour amplifier le fragment code-barres COI.

Tableau 2 : Liste des séquences des amorces et cycles d'amplification en fonction des fragments FC ou BR (gène COI)

Tableau 3 : Liste des amorces et conditions d'amplification des différents fragments pour les quatre gènes sélectionnés.

Tableau 4 : Liste des espèces d'*Eurydema* ouest-paléarctiques étudiées et récoltées par année.

Tableau 5 : Résumé du nombre de spécimens étudiés en biologie moléculaire par espèces.

Tableau 6 : Matrice de distances interspécifiques calculées à partir des séquences COI avec le modèle d'évolution K2P.

Tableau 7 : Tableau résumant les clés de détermination disponibles pour les 7 espèces françaises.

Tableau 8 : Résumé de l'ensemble des séquences disponibles dans les bases de données existantes NCBI et BOLD, tous gènes confondus.

Tableau 9 : Résumé du nombre d'échantillons par espèces étudiés pour chaque technique.

Tableau 10 : Résumé du nombre d'échantillons étudiés par espèce pour chaque étude de morphométrie.

Tableau 11 : Résultats de fiabilité et de reproductibilité des observations morphologiques.

Tableau 12 : Matrice de distances interspécifiques avec les écarts-types calculés à partir des séquences COI avec le modèle d'évolution K2P.

Tableau 13 : Matrice de distances intra-spécifiques à partir des séquences COI avec le modèle d'évolution K2P.

Tableau 14 : Liste des positionnements dans les arbres phylogénétiques de trois échantillons *Lygus* en fonction des gènes étudiés.

Tableau 15 : Résumé des informations statistiques après analyse Stacks M2n10S8L100.

Tableau 16 : Résumé des pourcentages de loci non utilisés par échantillon.

Introduction

D'après Henry (2009), il y aurait plus de 5 000 genres de punaises et Streito et Germain (sous presse) estime le nombre d'espèces à près de 44 000 décrites mondialement et encore existe-t-il beaucoup d'autres nouvelles espèces à découvrir. Les punaises représentent environ 40 % des Hémiptères, ordre qui regroupe environ 10% tous les insectes connus soit la cinquième position parmi les ordres d'insectes les plus diversifiés (après les Coléoptères, Diptères, Hyménoptères et Lépidoptères) (Forero, 2008). La biodiversité réelle du groupe est quant à elle très difficile à apprécier. Il s'agit d'un ordre varié qui regroupe des insectes aussi différents que les cigales, punaises, pucerons, cicadelles ou cochenilles. Leur régime alimentaire est aussi diversifié car on y rencontre une majorité de phytophages mais aussi des prédateurs (Reduviidae, Nepidae, Anthocoridae...) et même des hématophages, au rang desquels la fameuse punaise des lits *Cimex lectularius* Linnaeus, 1758 (Heteroptera, Cimicidae) et certaines réduves de la sous-famille des Triatominae vectrices de la maladie de Chagas. Les Hémiptères comptent de nombreuses espèces d'intérêt agronomique, à la fois des ravageurs et des auxiliaires. Au cours des décennies précédentes, le nombre de punaises dans les cultures légumières a très régulièrement augmenté. Comme par exemple, *Nezara viridula* (Linnaeus, 1758) la punaise verte qui a vu son nombre d'individus et son aire de répartition augmentés mais également l'invasion de nouvelles espèces comme *Hyalomorpha halys* (Stål, 1855) plus connue sous le nom de punaise diabolique. Du fait de la montée en puissance de l'agriculture biologique d'une part, et de la politique agricole préconisant de réduire l'usage d'insecticides et autres pesticides d'autre part, les dégâts occasionnés par les punaises phytophages sont en augmentation depuis quelques années et peuvent conduire à des pertes importantes de production en cultures légumières sous abri, notamment en agriculture biologique (Streito et Bout, 2019a). En effet, du fait de la réduction des moyens de lutte jusque-là efficaces, l'activité de ces ravageurs ré-émergents rend la protection intégrée des cultures sous abris délicate. Dans le même temps, il est apparu que la connaissance sur la caractérisation, la biologie et le comportement en culture de plusieurs espèces de punaises phytophages étaient encore à améliorer pour permettre de mettre au point des stratégies globales de protection. C'est dans ce contexte que le Centre Technique Interprofessionnel des Fruits et Légumes (CTIFL) a monté un projet de recherche Caisse d'Affectation Spéciale Développement Agricole et Rural (CASDAR) nommé IMPULsE (développement et Intégration de Méthodes innovantes pour la maîtrise des PUnaises en cultures LEgumières : 2017-2020). Le Centre de Biologie pour la Gestion des Populations (CBGP), en tant qu'unité de recherche partenaire du projet IMPULsE, est responsable de l'action 1.1 qui concerne l'identification et le suivi des punaises phytophages ciblées dans plusieurs régions de production et de fournir des outils d'identification des espèces de punaises fiables et simples. Mon travail s'inscrit dans ce cadre et concerne plus

particulièrement la caractérisation de deux genres de punaises ravageuses de culture, dont un qui contient un complexe d'espèces.

1. Problématique punaises en cultures légumières : les espèces impliquées

Les punaises phytophages qui causent des dégâts aux cultures légumières sont des insectes de l'ordre des hémiptères et du sous-ordre des hétéroptères du type piqueur-suceur, souvent polyphages, qui peuvent piquer divers organes de la plante tels que fleurs, feuilles, fruits ou graines pour y aspirer la sève ou tissus liquéfiés par leurs enzymes digestives. Leurs attaques sur les cultures, en nette augmentation depuis quelques années, sont sans doute en partie liées à la réduction des traitements insecticides consécutive à la mise en œuvre de la protection intégrée sous abris et à l'utilisation de produits à action plus spécifique, mais d'autres changements sont sans doute également impliqués comme le réchauffement climatique (Keizi Kiritani, 2011) et la mondialisation des échanges favorisant l'arrivée d'espèces envahissantes (Roques et al., 2009). Certaines familles de punaises comme les Pentatomidae et les Miridae sont ainsi devenues des ravageurs importants en quelques années.

Je me suis focalisée sur deux grands groupes de punaises en fonction des cultures attaquées : les punaises ravageuses des choux (Pentatomidae, genre *Eurydema*) et les punaises qui attaquent les cultures légumières sous abris (surtout tomates et aubergines) (Miridae, genre *Lygus*). D'après des inventaires préliminaires réalisés en France entre 2014 et 2016 par le CTIFL et le CBGP (J.-C. Streito, com. pers.), ce sont principalement la punaise verte *Nezara viridula* (Linnaeus, 1758) et les punaises ternes *Lygus* spp. qui sont les plus préoccupantes en cultures légumières sous abris, mais d'autres espèces telles que la punaise de l'ortie *Liocoris tripustulatus* (Fabricius, 1781), divers *Closterotomus* et *Adelphocoris* (Miridae) peuvent être également rencontrés. Par ailleurs, une punaise envahissante polyphage *Halyomorpha halys* (Stål, 1855), qui est en train d'envahir la France (Streito et al., 2020), va probablement venir renforcer ce cortège de ravageurs (Haye et al., 2015). Sur les choux, les punaises de la famille des Pentatomidae qui nous intéressent appartiennent au genre *Eurydema*, mais une autre espèce, *Bagrada hylaris* (Burmeister, 1835), devenue invasive en Californie et au Chili (Bundy et al., 2018), présente à Malte et sur l'île de Pantelleria (sud-ouest de la Sicile) pourrait venir compléter le cortège des Pentatomidae ravageurs. À ce jour, la biologie de ces ravageurs reste toutefois mal connue, notamment parce que l'identification des nombreuses espèces impliquées pose problème aux professionnels de la protection des plantes. Dans ce contexte, mon travail consiste à chercher et fournir des outils d'identification morphologique et moléculaire pour les espèces impliquées dans ce cortège de ravageurs. Mon mémoire traitera dans une première partie des punaises du chou du genre *Eurydema*. Dans un second temps, je me focaliserai sur le genre *Lygus*, qui s'est révélé contenir un complexe d'espèces, particulièrement compliqué d'un point de vue taxonomique.

2. L'identification des *Eurydema* et des *Lygus* : une entreprise compliquée

Le genre *Eurydema*

Ce genre de punaise fait partie de la famille des Pentatomidae, de la sous-famille des Pentatominae et de la tribu des Strachiini. Ce genre paléarctique comprend une quarantaine d'espèces connues, dont près de 25 dans la région euro-méditerranéenne. Certaines espèces sont très nuisibles aux cultures, notamment de Crucifères ornementales ou vivrières. Les larves et les adultes attaquent les parties végétatives et reproductives à un degré suffisamment sévère pour justifier des traitements appropriés (Derjanschi et Péricart, 2005). Au niveau de la systématique, il existe de nombreux travaux dont un cité plus loin incluant des clés de détermination pour l'Europe (Derjanschi et Péricart, 2005) ou pour la France (Dupuis, 1951 ; Lupoli et Dusoulier, 2015). De nombreuses synonymies du nom de genre ont été faites et Dupuis (1951) a proposé 3 sous-genres. Les clés de détermination prennent en compte des critères sur la couleur du dos et du ventre, ainsi que les pièces génitales des mâles. Toutefois, l'identification des espèces reste difficile car souvent basée sur des critères de couleurs et de formes des dessins dorsaux, qui sont très variables. Si la taxinomie est relativement stabilisée depuis Derjanschi et Péricart (2005), il reste des confusions héritées de l'histoire concernant les noms de divers taxa. Ainsi une partie des références anciennes concernant *E. ornata* Linnaeus, 1758 sont à rapporter à *E. ventralis* Kolenati, 1846, et celles concernant *E. festiva* Linnaeus, 1967 doivent s'appliquer à *E. dominulus* (Scopoli, 1763) (Derjanschi et Péricart, 2005).

Le genre *Lygus*

Le genre *Lygus* (les punaises ternes) compte plus de cent cinquante espèces au niveau mondial et fait partie de la famille des Miridae. On reconnaît actuellement vingt-neuf espèces néarctiques, vingt espèces paléarctiques et deux espèces holarctiques et en France, sept espèces sont observées (Schwarz et Footit, 1998). Ces punaises occasionnent énormément de dégâts aux parties aériennes des plantes, notamment aux USA où plusieurs espèces autochtones sont des ravageurs bien connus (Schaeffer et Panizzi, 2000).

Lorsque ces punaises du genre *Lygus* se nourrissent (à la fois aux stades larvaires ou adulte), leurs glandes salivaires sécrètent une substance toxique qui tue les cellules végétales voisines du point de piqûre causant des nécroses et l'apparition de lésions (Holopainen et Varis, 1991). En France, cela impacte les cultures de fraises, d'aubergines, de tomates, de concombres, de poivrons, des cultures semencières occasionnant des dégâts variés qui se manifestent de deux façons ; soit par la chute prématurée des boutons floraux, soit par des malformations sur les fruits (Streito et Bout, 2019b).

La taxinomie du genre *Lygus* n'a jamais pu être résolue de manière satisfaisante par des critères morphologiques. Le genre *Lygus* sensu lato (Carvalho, 1956 ; Schwartz et Footit, 1998) est mal défini au niveau mondial et plusieurs nouveaux genres ont été créés dernièrement sans que toutes les espèces, notamment asiatiques, aient été correctement replacées (Yasunaga et al., 2018). La situation est encore

plus confuse pour l'identification des espèces (Aglyamzyanov, 2006). Les clés d'identification classiques basées sur des critères morphologiques comme celle de Wagner et Weber (1964) ne permettent pas l'identification fiable des espèces européennes et il n'existe pas de clé récente qui soit meilleure. La révision magistrale de Schwartz et Foottit (1998) sur la morphologie des espèces nord-américaines et paléarctiques n'apporte pas non plus de solutions à l'identification. Plus récemment, la thèse de Aglyamzyanov (2006) a exploré d'autres caractères comme les appareils génitaux femelles mais sans vraiment apporter d'avancées notables. Les collections du CBGP, en particulier celles réalisées par J.C. Streito, contiennent de nombreux spécimens de *Lygus* identifiés par un ou plusieurs spécialistes des Miridés et plusieurs spécimens portent des étiquettes d'identifications contradictoires suite au réexamen du même spécimen parfois par le même spécialiste ! Dans un premier temps, nous évaluerons donc la fiabilité de ces différents critères morphologiques pour identifier les espèces de *Lygus* européennes.

Dans le cadre de plusieurs projets de recherche dont Quarantine organisms Barcode Of Life (QBoL), nous avons séquencé plusieurs espèces de *Lygus*, notamment américaines. Les premières analyses nous ont montré que le fragment barcode COI standard (gène de la Cytochrome Oxydase : voir chapitre 2-2) n'était pas suffisant pour identifier et distinguer les espèces. Une étude sur des espèces chinoises conforte cette observation (Zhang et al., 2017). La publication de Raupach et al. (2014) confirme aussi l'importance de chercher de nouvelles méthodes pour identifier les *Lygus* européens.

Une identification correcte des Miridae est souvent entravée par la difficulté d'interprétation des caractères morphologiques utilisés historiquement, et des biais ou des insuffisances dans les données moléculaires disponibles dans les bases de données publiques. Du fait de ces difficultés, il est essentiel de développer une approche précise de l'identification des espèces, en particulier pour les espèces potentiellement nuisibles (Piemontese et al., 2020).

3. Objectifs du diplôme

La question générale à laquelle je me propose de répondre dans le cadre de mon travail de stage pour l'obtention de mon diplôme EPHE est la suivante :

Comment peut-on caractériser, sans ambiguïté et à tous les stades de développement, les différentes espèces européennes d'une part de punaises du chou (*Eurydema*), et d'autre part de punaises ternes (*Lygus*) ?

Pour y répondre, mon travail s'est basé sur le concept de la taxinomie intégrative définie comme la science qui vise à délimiter les unités de diversité (espèces, genre...) selon des perspectives multiples et complémentaires (phylogéographie, morphologie comparative, génétique des populations, écologie, développement, comportement, etc.). La taxinomie intégrative donne la priorité à la délimitation des espèces plutôt qu'à la création de nouveaux noms d'espèces (Dayrat, 2005).

Ainsi, la taxinomie intégrative propose un panel très large de techniques différentes pour répondre à nos questions. Toutes ne peuvent être mises en œuvre dans le cadre du présent travail, mais en relation avec

les moyens et compétences dont nous disposons au CBGP (plateaux techniques « collection » et « biologie moléculaire »), mon travail sera basé sur des approches morphologiques et moléculaires.

En ce qui concerne l'utilisation de critères morphologiques, j'aborderai les questions suivantes : les clés d'identification basées essentiellement sur la couleur sont-elles fiables et répétables ? Existe-t-il des critères morphologiques pertinents pour différencier les espèces ? Des études morphométriques permettraient-elles de confirmer certains caractères diagnostics et de fiabiliser leur utilisation ? L'histoire taxonomique de nos deux modèles ayant montré les limites des caractères morphologiques notamment pour différencier tous les stades de développement, mon travail se basera également sur des outils moléculaires et les questions suivantes : le code-barres standard COI permet-il de différencier les espèces et confirme-t-il les clés morphologiques ? Existe-t-il d'autres marqueurs ou d'autres techniques plus pertinents ? Les techniques moléculaires récentes basées sur le séquençage haut-débit permettent-elles de mieux discriminer les espèces ?

Ainsi mon mémoire se composera de 4 grands chapitres. Dans le premier chapitre, je présenterai les définitions générales de taxinomie, systématique et taxinomie intégrative, ainsi que les méthodes générales que j'appliquerai à mes deux modèles d'étude. Ensuite, j'aborderai chaque modèle en commençant par le genre *Eurydema* et ensuite le genre *Lygus*. Le dernier chapitre sera une discussion générale et conclura sur mon travail de 3 ans de recherche sur ces deux modèles.

Chapitre I : Généralités

A/-Définitions : Systématique, Taxonomie, Taxinomie intégrative

1- Systématique ou taxinomie ?

Dans un premier temps, il est nécessaire d'expliquer ce qu'est la systématique et à quoi cela sert ainsi que la différence entre systématique, taxonomie et taxinomie. En effet, souvent il existe un amalgame entre ces trois termes qui sont parfois considérés comme des synonymes et pourtant ils ont chacun une définition. La systématique est une science biologique dont l'objectif est de chercher, par l'analyse des données biologiques disponibles, à établir une classification synthétique des êtres vivants, représentative de leurs liens de parenté et de leur histoire évolutive (Tillier et al., 2000).

En d'autres termes, la systématique correspond à la discipline scientifique permettant la classification des espèces les unes par rapport aux autres. Elle repose sur la mise en place de méthodes logiques permettant de dénombrer, de décrire, de classer et d'organiser les groupes vivants sur la base de principes cohérents. Par exemple, la phylogénie c'est-à-dire l'histoire évolutive des espèces permet de classer et de traiter la diversité biologique et d'établir une classification à partir des relations de parenté établies sur la base des séquences de gènes ou d'autres caractères notamment morphologiques.

1-1 Qu'est-ce que la taxinomie?

Certains auteurs considèrent que systématique et taxinomie sont deux termes équivalents. Je retiendrai une définition plus restrictive limitée à la description et au regroupement des êtres vivants en taxons. Quant à taxonomie et taxinomie, je les considère comme des synonymes, vu que ce sont deux transcriptions de deux expressions grecques identiques et j'utiliserai taxinomie par la suite. Un taxon est une entité regroupant tous les organismes vivants possédant en commun certaines caractéristiques bien définies (qui ont des similitudes les uns avec les autres et qui montrent des différences avec les organismes d'autres taxons). L'organisation des organismes peut être représentée par un arbre (Tree of Life) avec un tronc donnant des branches se ramifiant progressivement en branches de plus en plus petites. Chaque branche du début à la fin de l'arbre de la vie est considérée comme un taxon. Ces branches servent d'unités de classement selon sept catégories hiérarchiques principales qui sont, par ordre décroissant de niveau : le domaine (base de l'arbre) – le règne – le phylum – la classe – l'ordre – la famille – le genre – l'espèce (branchilles). Ces sept niveaux ne sont parfois pas suffisants pour classer clairement tous les êtres vivants. Dans certaines branches, il est nécessaire de créer des subdivisions intermédiaires, telles que la sous-espèce, le sous-ordre, la superfamille... Ces arbres peuvent ou non prendre en compte et représenter l'histoire évolutive du vivant. Ainsi la systématique n'est pas synonyme de taxinomie, qui s'attache à décrire et définir les taxons, mais plutôt son prolongement. Actuellement on n'imagine plus dissocier classification et histoire évolutive d'où un amalgame de plus en plus

fréquent entre les deux termes et les taxonomistes ont de tout temps, été également nommés systématiciens car, après avoir étudié et décrit des organismes, ils ont tout naturellement essayé de les classer en essayant ou pas de reconstituer leur histoire évolutive.

Un système de nomenclature existe. Cette nomenclature désigne l'ensemble des règles permettant de nommer un taxon. Le nom scientifique d'une espèce est désigné par un binôme de deux noms latins écrits en italiques (=nomenclature binomiale) (le premier avec une majuscule, le second sans). Le premier nom (avec la majuscule) correspond au nom de genre, le second à l'espèce proprement dite. Chaque nom d'espèce est suivi du nom du descripteur de l'espèce et de la date de description.

1-2 Qu'est-ce qu'une espèce ?

L'unité fondamentale sur laquelle toute la classification est basée est l'espèce. Il s'agit du niveau taxonomique qui, d'un point de vue biologique et donc pratique, nous intéresse également.

La définition d'une espèce est délicate car il n'existe pas de critère absolu qui parvienne à satisfaire toute la communauté scientifique (Ravigné et al., 2010). Une partie des problèmes de définition de la notion d'espèce semble directement liée à la difficulté de définir les critères qui caractérisent et permettent de délimiter pratiquement cette entité. Le grand nombre d'études dans ce domaine illustre bien la complexité du problème (voir entre autres Dobzhansky, 1937 ; Mayr, 1942 ; Harlan et De Wet, 1963 ; Avise et Ball, 1990 ; Mayden, 1997 ; Wilson, 1999 ; Wheeler et Meier, 2000 ; Noor, 2002 ; de Queiroz, 2007). Au cours du XXe siècle, plus d'une vingtaine de définitions de l'espèce ont été proposées (Mayden, 1997). Ci-dessous sont listées les principales définitions du terme « espèces » qui se sont succédées et complexifiées au cours des siècles.

Pour Linné (1707-1778), fondateur de la taxinomie et de la nomenclature binomiale pour la désignation de l'espèce : « toutes les espèces tiennent leur origine de leur souche, en première instance, de la main même du Créateur tout puissant, car l'auteur de la nature, en créant les espèces, imposa à ces créatures une loi éternelle de reproduction et de multiplication dans les limites de leur propre type ». Dans ce cadre défini et considéré comme fixiste, l'espèce est donc définie comme un ensemble d'individus qui se reproduisent et engendrent des individus semblables à eux-mêmes. Mais cette définition ne laisse pas de part à l'évolution et aux différences qui peuvent exister entre différents individus ni à la transformation des espèces.

Cette approche du transformisme naît plus tard avec Ray (1627-1705), Buffon (1707-1788) et Lamarck (1744-1829), où les espèces actuelles sont la continuation d'espèces antérieures. Il existe ainsi une transformation des espèces à partir d'un ancêtre commun. C'est la première fois qu'est introduite l'idée de continuité et de transformation entre les êtres vivants. Les espèces sont alors définies selon des critères qui sont la ressemblance, la descendance et l'interfécondité. Mais cette approche n'explique pas les mécanismes d'apparition et de disparition des espèces.

Cuvier (1769-1862) explique l'apparition et la disparition des espèces sans toucher à leur invariabilité car il continue de définir l'espèce comme « la collection de tous les corps organisés, nés les uns des autres ou de parents communs et de ceux qui leur ressemblent autant qu'ils se ressemblent entre eux ». L'extinction des espèces serait liée à des catastrophes soudaines et violentes, suite auxquelles on retrouverait ces espèces sous forme de fossiles, ce qui laisserait la place pour la formation de nouvelles espèces, qui apparaîtraient *ex nihilo*. En effet, Cuvier, en tant que paléontologiste influencé par les théories créationnistes cherchait ainsi à expliquer les extinctions et la présence de successions de faunes différentes dans les divers étages géologiques (les espèces éteintes étaient celles qui n'avaient pas trouvé de place dans l'arche de Noé !).

Charles Darwin (1809-1882) puis Alfred Russel Wallace (1823-1913) au XIXe siècle lors de la séance du 1^{er} juillet 1858 de la Linnean Society de Londres exposent pour la première fois la théorie de « la descendance avec modification ». Darwin amènera la notion de sélection naturelle pour expliquer la « transformation des espèces ». Les individus favorisés par la sélection naturelle transmettent leurs caractéristiques à la génération suivante. Ainsi, il conclut que les espèces s'adaptent sans cesse à leur milieu, se diversifient ou disparaissent. Son postulat : le mécanisme de l'évolution repose sur la sélection naturelle.

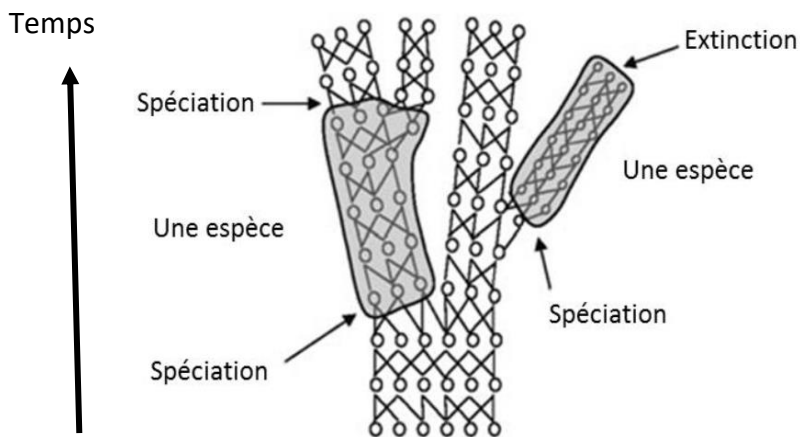


Figure 1 : Représentation de l'espèce et de son devenir au cours du temps. Les cercles représentent des individus reliés entre eux par des traits matérialisant leurs relations. Les parties grisées représentent une espèce. Celles-ci sont délimitées par des événements de spéciation ou d'extinction, d'après une illustration de Samadi et Barberousse (2006).

Samadi et Barberousse (2006) représentent schématiquement la notion d'espèce comme une branche au sein de laquelle des individus sont généalogiquement reliés entre eux et où chaque branche peut donner de nouvelles branches (événement de spéciation) ou s'arrêter (événement d'extinction) mais où deux branches disjointes ne peuvent pas se rejoindre (différenciation irréversible

permettant l'apparition de nouvelles branches ; Figure 1).

L'introduction de cette notion d'évolution dans le temps entraîne un problème pratique et technique dans la définition de l'espèce, celui de sa délimitation. De là, vient la problématique de mon mémoire mais aussi tout son intérêt !

2- Comment délimiter des espèces : les différents critères utilisés

Plusieurs critères issus de différentes disciplines ont été utilisés afin de délimiter les espèces (Sites et Marshall, 2004) et différents champs disciplinaires de la biologie permettent d'éclaircir cette notion d'espèce et de délimitation. Ainsi, la morphologie et la morphométrie s'attachent à la notion de ressemblance physique, la génétique à celle d'interfécondité, la cladistique à celle de descendance et de l'évolution des caractères, et la biologie moléculaire à celle d'homologie des séquences d'ADN. Je vais décrire les avantages et les inconvénients de chaque discipline, en me basant sur l'article de De Queiroz (2007) qui donne une vision plus consensuelle sur les concepts d'espèces.

Regrouper des individus qui se ressemblent : rechercher des critères pour définir les espèces

2-1 Critère morphologique

La description morphologique est l'une des premières méthodes d'identification et de définition des espèces et c'est encore une méthode très utilisée en taxinomie. Elle repose sur l'utilisation de caractères morphologiques communs ou non à plusieurs individus, sur la base de critères phénétiques (observables et quantifiables). Le postulat est que les individus d'une même espèce se ressemblent plus entre eux qu'ils ne ressemblent aux individus d'autres espèces. Cependant, il existe un certain nombre de biais et de limites comme, par exemple, le dimorphisme sexuel (différences prononcées entre mâles et femelles), des variations saisonnières liées à la température, au stade physiologique etc. de façon générale le polymorphisme. De même, la fixation d'un caractère morphologique n'est pas instantanée et donc les espèces dont la divergence est récente peuvent encore partager des caractères ancestraux. Une autre limite est qu'il existe des espèces cryptiques qui ne présentent pas de différences morphologiques visibles mais qui sont génétiquement différentes (Bickford et al., 2007), et qui peuvent avoir des biologies ou des comportements différents. A l'inverse, les individus d'une même espèce peuvent différer morphologiquement les uns des autres parfois de manière très importante sans qu'il n'existe de stérilité même partielle entre des individus très différents. Enfin, les descriptions morphologiques ne permettent pas toujours d'identifier les cas de convergence évolutive car un caractère partagé n'est pas obligatoirement lié à une histoire évolutive commune (par exemple les ailes chez les insectes, les oiseaux et les chauves-souris ; Harry, 2005).

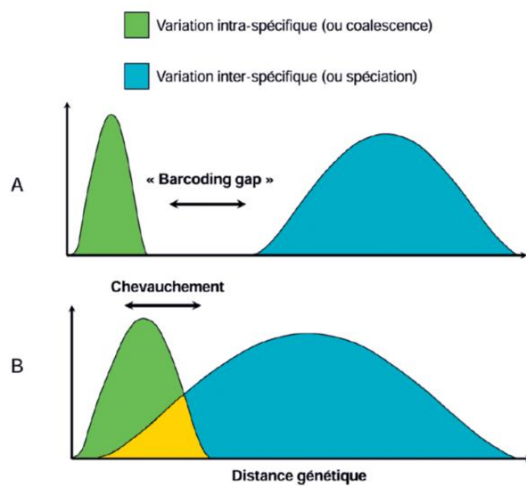
2-2 Critères moléculaires : « barcoding » et le « barcoding gap »

Dans l'approche de type « barcoding » (codage à barres ou code-barres en français), les espèces sont caractérisées sur la base d'une séquence d'ADN commune. Ainsi cette technique permet de caractériser génétiquement un individu et de lui assigner un nom d'espèce sur la base de la variation de la séquence d'ADN d'un ou de plusieurs gènes. Le barcoding repose sur la variabilité d'un fragment d'ADN judicieusement choisi de façon à ce que la variabilité intra-spécifique soit faible, et la variabilité inter-spécifique, relativement forte. Dans ce cas, la distribution des distances génétiques entre tous les

individus est bimodale et les deux modes sont séparés par un espace appelé « barcoding gap » (voir Figure 2). De manière simpliste, un seuil de différenciation peut être caractérisé pour chaque groupe taxonomique (de 2 à 12 % selon les taxa) au-dessus duquel les groupes n'appartiennent pas à la même espèce mais forment à la place un taxon supra-spécifique (Meyer et Paulay, 2005). Chaque espèce serait donc identifiable grâce à la séquence de ce fragment, qui serait alors l'équivalent d'un code-barres. Chez la plupart des animaux, et en particulier chez les insectes, c'est la première moitié du gène mitochondrial de la première sous-unité de la cytochrome oxydase moléculaire (COI), une protéine qui intervient dans la chaîne respiratoire de la mitochondrie, qui fait office de code-barres (Hebert et al., 2003). Chaque cellule contenant de nombreuses mitochondries, le gène COI est présent en de nombreuses copies, ce qui facilite son séquençage. De plus, ce gène présente un niveau de variabilité intéressant: le nombre de différences apparues par mutations au cours du temps entre les séquences de ce gène est généralement faible entre les individus d'une même espèce et élevé entre individus d'espèces différentes. C'est ainsi que cette séquence d'ADN peut être utilisée, à l'instar des code-barres dans le commerce, comme un outil d'identification taxonomique des organismes vivants : tous les individus d'une espèce présentent des séquences identiques ou très proches, ce qui va permettre l'identification d'un spécimen en comparant sa séquence avec celles des espèces connues. Cette autre possibilité de classer et de regrouper les êtres vivants en utilisant l'identification moléculaire (Hebert et al., 2003) possède plusieurs caractéristiques intéressantes dont la standardisation, une automatisation possible, une ou des banques de référence se construisent, et cette méthode peut s'appliquer à tous les stades de développement de l'insecte (larves-œufs).

Le succès de l'identification par code-barres repose sur le fait que la diversité génétique est nettement plus faible au sein d'une même espèce qu'entre les espèces. Cette hypothèse est susceptible d'être brisée parfois, en particulier lorsque les taux de spéciation sont supérieurs aux temps de coalescence du gène en question. Ainsi, le taux de réussite du codage à barres varie sans aucun doute selon les situations, certaines pouvant se révéler particulièrement génératrices de difficultés. Cela peut être notamment le cas dans les groupes où les taux de spéciation récente sont élevés et les tailles effectives des populations importantes et stables, comme par exemple chez de nombreux insectes tropicaux (Elias et al., 2007). Certaines publications mettent en évidence que la caractérisation moléculaire avec les codes-barres ADNmt atteint une précision proche de 100% pour délimiter correctement toutes les espèces de certains groupes (Hebert et al., 2004 ; Hajibabaei et al., 2006 ; Clare et al., 2011 ; Ekrem et al., 2010 ; Kerr et al., 2007), mais dans d'autres cas, cette délimitation s'est révélée moins nette (Meyer et Paulay, 2005 ; Meier et al., 2006 ; Wiemers et Fiedler, 2007 ; Whitworth et al., 2007).

Au final, même si Hebert et al., (2004) ont suggéré l'utilisation d'un seuil de divergence de séquence pour définir de nouvelles espèces, en affirmant que le code-barres pourrait être un outil remarquable à cette fin, des précautions s'imposent. En effet, l'existence de ce que l'on appelle le



« barcoding gap » (Figure 2) a été remise en question pour des raisons tant théoriques (Hickerson et al., 2006) qu'empiriques (Cognato, 2006 ; Wiemers et Fiedler, 2007). Différents complexes d'espèces et de genres (Whinnett et al., 2005) alimentent ces critiques. Il est maintenant acquis que la méthode du code-barres ne doit pas être utilisée comme seule base pour mettre en évidence de nouvelles espèces (Elias et al., 2007).

Figure 2 : Barcoding gap. La distribution de la variation intra-spécifique est indiquée en vert, et la variation interspécifique en bleu. (A) : Dans un cas optimal, la variation génétique intra et interspécifique ne se chevauchent pas et on peut observer un « barcoding gap ». (B) : Une situation où les variations intra et interspécifiques sont chevauchantes (en jaune) et ne permettent plus de discriminer les individus ce qui augmente le taux d'erreur à l'assignation. (Elias et Condamine, 2014)

3- Concept et critères d'espèce

3-1 Critère phylogénétique

Le concept phylogénétique de l'espèce proposé par Hennig (1966) considère que seuls les groupes monophylétiques, c'est-à-dire les groupes comprenant l'ancêtre commun le plus récent et ses descendants, permettent de définir les espèces. La phylogénie est à la base de nombreuses méthodes utilisées aujourd'hui pour délimiter les espèces (Sites et Marshall, 2003 ; O'Meara et al., 2006 ; Pons et al., 2006 ; Ence et Carstens, 2011 ; Hambäck et al., 2013). Pour mettre en évidence les liens de parenté ces méthodes utilisent la construction d'arbres dits phylogénétiques. On distingue trois méthodes principales pour construire des arbres phylogénétiques : de distance (ou phénétique), de parcimonie (ou cladistique) et probabilistes (incluant le maximum de vraisemblance et l'analyse bayésienne). Ainsi, la reconstruction d'arbres phylogénétiques peut, par exemple, se faire sur la base de caractères morphologiques ou sur des séquences d'ADN. L'importance du polymorphisme de certains des caractères utilisés peut à ce stade représenter un biais en favorisant artificiellement le regroupement d'individus d'espèces différentes ou inversement la séparation d'individus conspécifiques. Un autre biais de reconstruction est l'homoplasie qui est la similitude d'un état de caractère chez différents taxons qui, contrairement à l'homologie, ne provient pas d'un ancêtre commun.

3-2 Critère écologique

Van Valen (1974) propose le concept de niche écologique basé sur un ou des critères écologiques. La niche écologique correspond au rôle de l'espèce dans le fonctionnement de l'écosystème.

Les dimensions de l'espace représentent une ressource ou une condition environnementale (Hutchinson, 1957, cité dans Soberon, 2007). D'après le principe d'exclusion de Gause (1934), deux espèces distinctes ne peuvent pas partager exactement la même niche. Ce principe stipule que les populations de deux espèces ayant des exigences écologiques identiques, c'est-à-dire exploitant une ressource limitante unique, ne peuvent coexister indéfiniment dans un milieu stable et homogène. C'est le « principe d'exclusion par compétition » qui prévoit que l'espèce qui est la plus efficace dans l'utilisation d'une ressource limitée du milieu finit par éliminer la ou les espèces voisines, moins aptes à cette utilisation. L'exclusion des espèces s'effectue moins par attaque directe que par privation des facteurs vitaux objets de la compétition (préférences de lieu, besoins en eau et en nutriments, etc., chez les plantes; choix de la nourriture, lieux d'alimentation, choix des abris, des lieux de reproduction, etc., chez les animaux). L'exclusion impose au vaincu de nouvelles conditions de vie se traduisant par l'occupation d'une nouvelle niche. Ainsi, deux espèces peuvent être distinguées en étudiant leur niche écologique occupée, mais il est souvent difficile de connaître chaque dimension de la niche écologique.

3-3 Autre critère : le comportement

D'autres critères comme les sons (chants, cris...) ou encore les comportements de cour (recherche de partenaires sexuels) peuvent permettre de délimiter des espèces. Ainsi, des cigales ou même les criquets peuvent être distingués grâce à leur comportement vis-à-vis des sonorités (chants) émises par les partenaires sexuels et leurs congénères. La cymbalisation est produite chez le mâle cigale et a pour fonction d'attirer les femelles. Ce « chant » est variable d'une espèce de cigale à une autre (Sueur et Puissant, 2007).

Depuis une dizaine d'années, différentes études ont été effectuées sur les espèces du genre *Chrysoperla* (Neuroptera, Chrysopidae). A l'aide d'approches multiples, ces études ont permis de mettre en évidence l'existence d'espèces cryptiques (regroupement de deux ou plus, espèces qui se ressemblent tellement entre elles qu'il est impossible de les distinguer l'une de l'autre d'un point de vue physique, même si elles satisfont tous les autres critères de définition d'une espèce). Citons les études basées sur la comparaison des chants dus aux fréquences de vibrations (Henry, 1985 ; Henry et al., 1996), ainsi que sur la variabilité éco-physiologique (Thierry et al., 1992).

Un cas typique de différenciation des espèces par le comportement est souvent représenté par les mouches d'Hawaï: *Drosophila heteroneura* (Perkins, 1910) et *Drosophila silvestris* (Perkins, 1910). En effet, les mâles ont un comportement agressif et font des joutes avec leurs têtes pour rechercher le partenaire sexuel (Boake et al., 1998). Ces deux espèces de mouches se différencient non seulement sur la base de ce comportement mais également par la morphologie de la tête qui varie en fonction du comportement agressif ou pas.

3-4 Critère d'interfécondité et critère d'interstérilité

Enfin, les espèces peuvent être définies sur le principe d'interfécondité : « une espèce est une population, ou un groupe de populations naturelles, effectivement ou potentiellement interfécondes, qui sont génétiquement isolés d'autres groupes similaires » (Mayr, 1942). L'impossibilité de reproduction par la mise en place de barrières géographiques, physiologiques, comportementales etc. empêchant les flux de gènes est un critère de délimitation des espèces : les individus d'espèces distinctes n'engendrent pas de descendance viable/fertile. L'isolement reproductif est évident lorsque les différences anatomiques sont grandes, dans d'autre cas les barrières sont beaucoup moins nettes. Dans certain cas, il est nécessaire de faire des expériences de croisements pour connaître le critère d'interstérilité.

Toutefois dans certains cas, les expériences de croisement peuvent être parfois sans réponse (pas de descendant, ou descendance qui ne s'hybride pas (Figure 3a)). Dans d'autres cas, comme par exemple, *Drosophila heteroneura* et *D. silvestris*, celles-ci donnent des descendants fertiles alors que ce sont deux espèces différentes ayant une différence majeure au niveau de la tête résultant d'une sélection sexuelle intra-spécifique entre mâles (Figures 3a et 3b descendants fertiles vs descendants stériles).

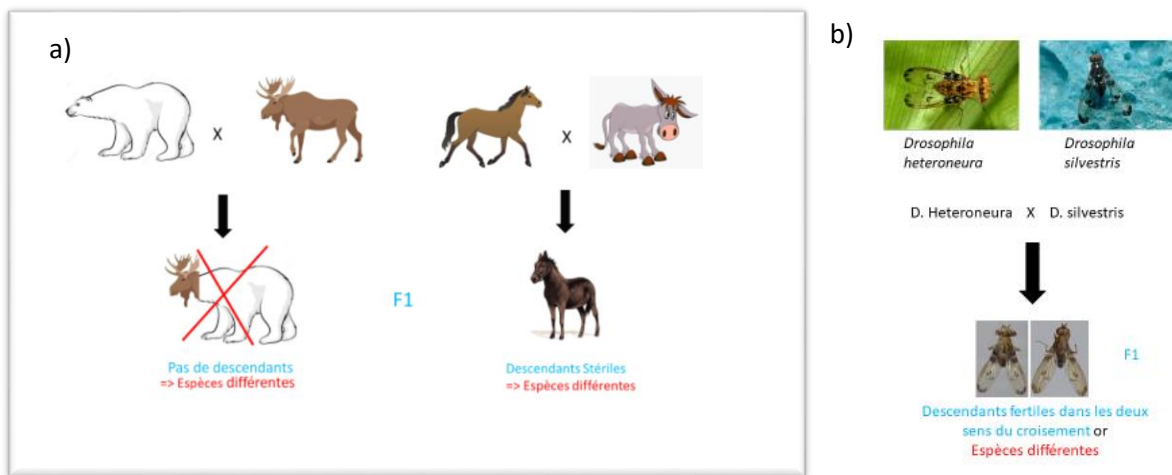


Figure 3 : Descendants fertiles vs descendants stériles. (a) L'obtention de la stérilité permet de conclure quant au statut spécifique des parents. Ils appartiennent alors à deux espèces différentes ; (b) En condition de laboratoire les deux drosophiles peuvent s'hybrider ce qui questionne leur statut d'espèces (modifié d'après la photo de Harry, 2008)

4- Taxinomie intégrative

La palette des critères et techniques disponibles pour caractériser et délimiter des espèces est étendue allant de la couleur, aux tests d'interfécondité en passant par les exigences écologiques fines. Souvent une seule méthode ne suffit pas à obtenir une délimitation satisfaisante d'espèces proches d'où l'idée de coupler les différentes méthodes disponibles. La taxinomie intégrative (combinaison de techniques) (Dayrat, 2005; Schlick-Steiner et al., 2010), est maintenant largement reconnue et utilisée dans les études d'identification et de délimitation d'espèces (Alström et al., 2008 ; Lumley et Sperling, 2010 ; Gebiola et al., 2012 ; Rougerie et al., 2012 ; Lumley et Cusson, 2013). Ainsi, par exemple, des études intégratives sur des parasitoïdes ont permis l'identification de 11 nouvelles espèces à l'intérieur

d'un complexe d'espèces d'*Eupelmus* (Al Khatib et al., 2014, 2016), ce qui amène de nouvelles connaissances pour la lutte biologique hôte-ravageur. En effet, si chacune des méthodes prise séparément peut aboutir à des erreurs d'identification et de délimitation, leur combinaison permet des identifications des espèces plus fiables.

Pour tenter de caractériser et de délimiter les espèces que je vais étudier, je vais employer la combinaison de plusieurs outils : le barcoding avec le COI mais aussi d'autres gènes, la morphologie et la morphométrie (à l'aide de points homologues ainsi que la géométrie de contour). Toutes ces techniques ont pu être mises en œuvre au CBGP. En revanche, il ne m'a pas été possible de réaliser des croisements expérimentaux sur des modèles biologiques aussi difficiles à élever dans le temps qui m'était imparti. En effet, il n'y a qu'une génération par an chez *Eurydema* et deux chez *Lygus*. Dans ce dernier cas, il s'est révélé également difficile d'être sûr et certain de la caractérisation des parents.

B/-Les modèles d'études : les Punaises

1- Qu'est-ce qu'une punaise?

Les punaises (Figure 4) font partie du règne animal, embranchement des arthropodes, de la classe des insectes et de l'ordre des hémiptères. Cet ordre est à présent considéré comme monophylétique sur la base de la structure particulière des pièces buccales piqueuses/suceuses composées d'un long rostre articulé comprenant deux paires de stylets (mandibulaires et maxillaires), logés dans une gouttière formée par le labium. Au sein de cet ordre, les punaises forment le sous-ordre des Hétéroptères dont la paire d'ailes antérieures est transformée en hémélytres. Les hémélytres sont des ailes antérieures à demi-sclérifiées comprenant une corie et une membrane (Schuh et Weirauch, 2020).

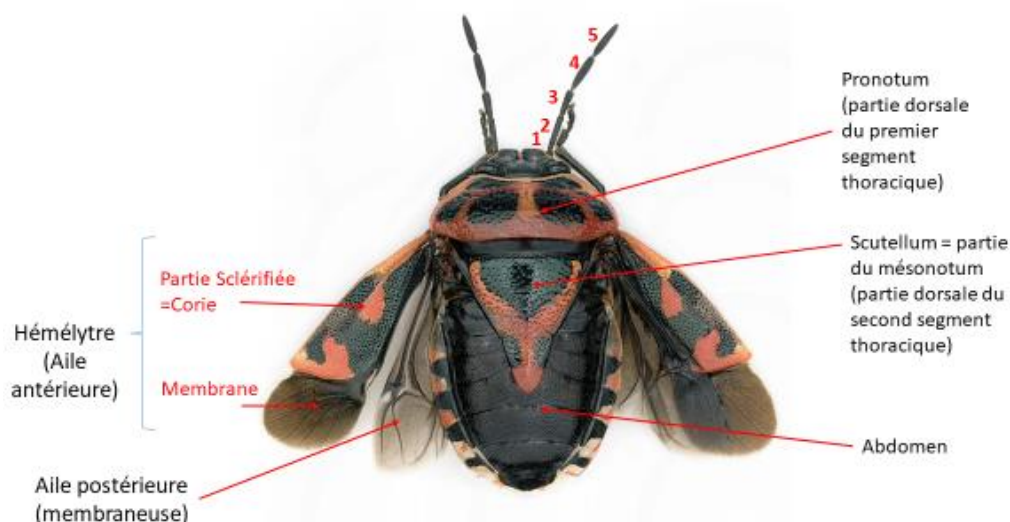


Figure 4: illustration des principaux critères pour définir une punaise, les chiffres de 1 à 5 représentent les segments antennaires. Photo d'un *Eurydema* effectuée par J.C Streito

2- Phylogénie et Classification des punaises

L'ordre des hémiptères est divisé en 4 ou 5 sous-ordres en fonction des auteurs qui regroupent ou pas les Cicadomorphes et les Fulgoromorphes en Auchenorrhynches. La figure 5 représente la

phylogénie moléculaire des hémiptères basée sur le génome mitochondrial complet (Li et al., 2017) et illustre les différentes unités taxonomiques.

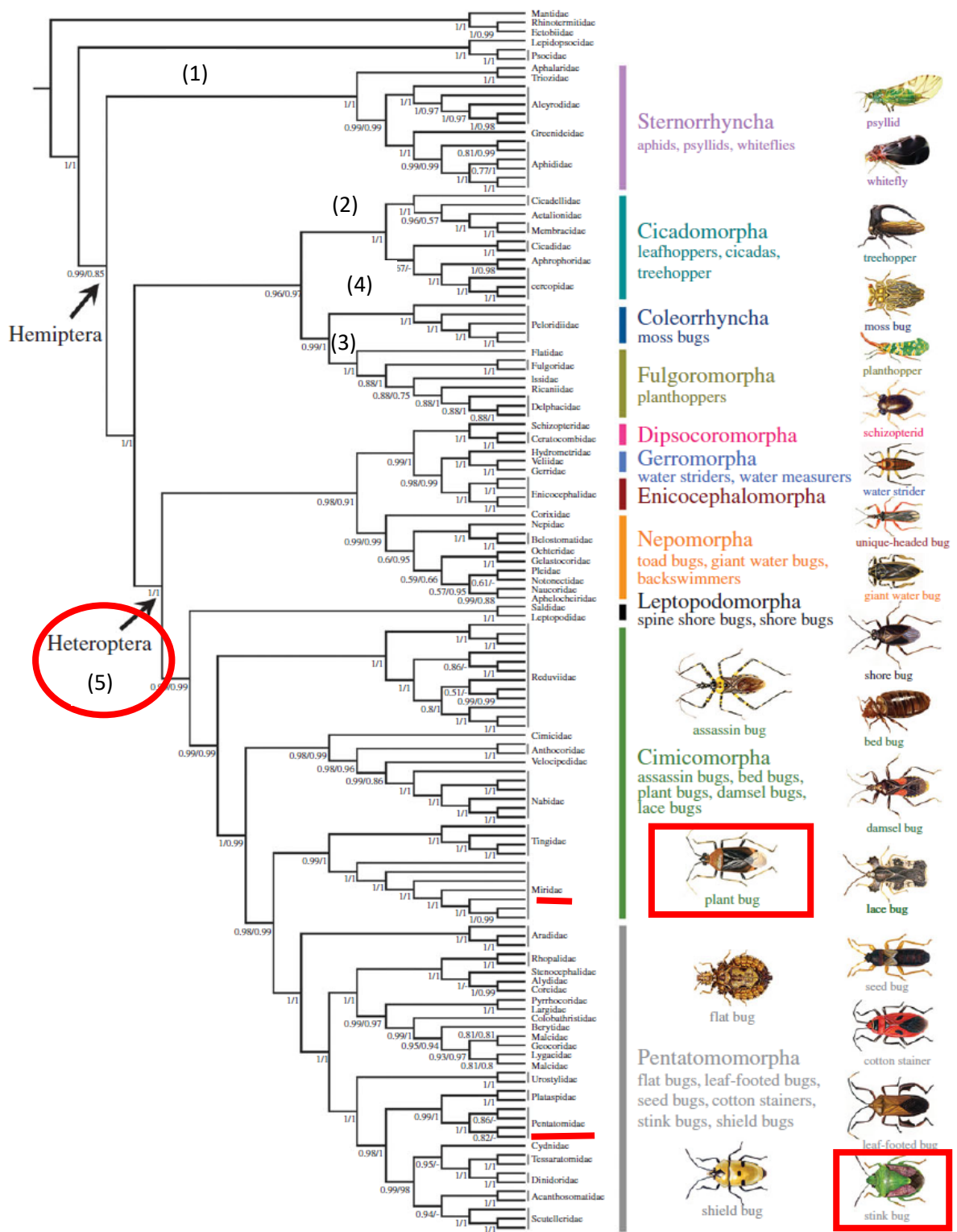


Figure 5 : Arbre phylogénétique des Hémiptères illustrant les principales unités taxonomiques des modèles étudiés ; sous-ordre encadré en rouge, familles soulignées en rouge et groupes encadrés en rouge. Figure modifiée à partir de Li et al., 2017.

Les 4 ou 5 sous-ordres reconnus sont les Sternorrhyncha (1), les Auchenorrhyncha (Cicadomorpha (2) et Fulgoromorpha (3)), les Coleorrhyncha (4) et les Heteroptera (5) (Figure 5). La division des Auchenorrhyncha en Cicadomorpha et Fulgoromorpha est encore en discussion (Forero, 2008 ; Cryan et Urban, 2012), mais pour mon mémoire, je considérerai ces 5 sous-ordres (Bourgoin et Campbell, 2002).

Comme dit précédemment, les hémiptères forment un groupe monophylétique sur la base de la structure de leur appareil buccal piqueur-suceur (Johnson et al., 2018). Cet organe qui caractérise le mieux les hémiptères est nommé rostre. Son point d'insertion a une valeur taxonomique importante et est utilisé pour séparer les différents sous-ordres. D'un point de vue pratique, 4 caractères permettent de reconnaître un hémiptère : la présence d'un rostre, de 4 ailes (en général), d'antennes comprenant de 1 à 10 articles, d'un scutellum souvent bien développé. Le thorax est constitué de trois segments (Figures 4 et 6) : le prothorax antérieur (appelé pronotum en face dorsale), le mésothorax intermédiaire (ou mésonotum en face dorsale) et le métathorax postérieur (ou métanotum en face dorsale). En vue dorsale on ne voit généralement que le pronotum et une pièce triangulaire du mésonotum que l'on appelle scutellum. Ce scutellum est plus ou moins développé. Le thorax porte les pattes, toujours au nombre de 6. Les ailes sont au nombre de 4 (avec toutefois de nombreuses exceptions), les antérieures sont souvent toutes ou en partie coriacées alors que les postérieures sont toujours membraneuses.

Pour situer les deux modèles sur lesquels mon étude a été faite, j'ai entouré sur l'arbre phylogénétiques (Figure 5) le sous-ordre des Hétéroptères et souligné et encadré les deux familles dont sont issus mes modèles : Pentatomidae pour *Eurydema* et Miridae pour *Lygus*. On trouvera une clé des familles dans Streito et Germain (sous presse) ou dans Schuh et Weirauch (2020).

Le genre *Eurydema*

Les *Eurydema* : Heteroptera/Pentatomomorpha/Pentatomoidea/Pentatomidae/Pentatominae/Strachinii

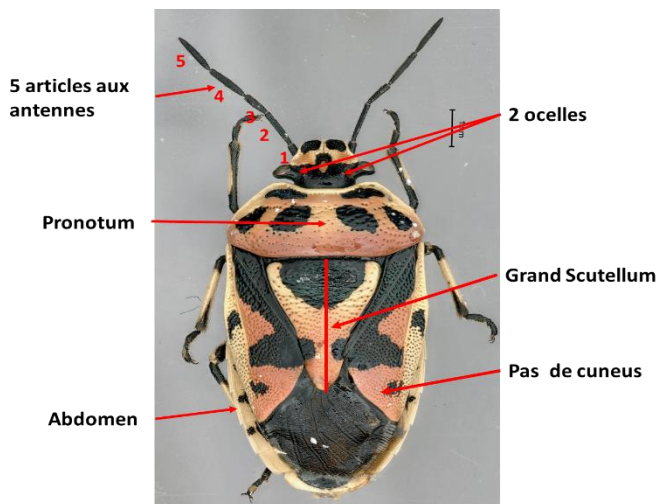


Figure 6 : Illustration des caractères permettant de caractériser la famille des Pentatomidae

Pour les *Eurydema* : quelques critères permettant de décrire la famille des Pentatomidae sont illustrés dans la figure 6. On trouvera une clé de détermination des genres dans Derjanschi et Péricart (2005).

- Antennes généralement composées de 5 articles
- Tibias non épineux, ou épines relativement peu développées ; coloration et taille variables
- Scutellum très développé, s'étendant au-delà du milieu de l'abdomen

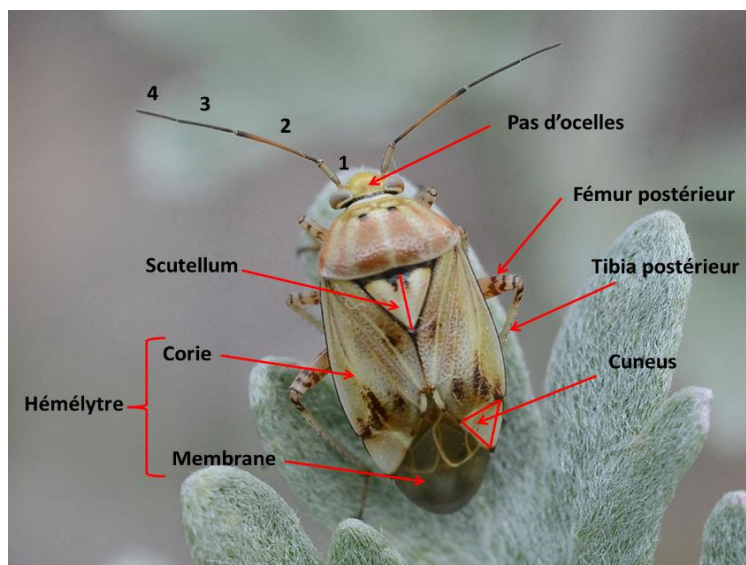
- Tarses formés de 3 articles
- Pronotum s'arrêtant à la base du scutellum et ne le surmontant pas
- Deux ocelles (yeux simples) bien séparés, antennes insérées en dessous de la marge latérale de la tête
- Taille 4 à 25 mm
- Pas de cuneus (voir Figure 7)

Le genre *Lygus*

Les *Lygus* : Heteroptera/ Cimicomorpha/ Miroidea/ Miridae/ Mirinae/ Mirini

On trouvera une clé de détermination des genres de France dans Wagner et Weber (1964).

Pour les *Lygus* : quelques critères permettant de décrire la famille des Miridae (Figure 7).



- Antennes de 4 articles.
- Œil composé présent mais pas d'ocelles.
- Scutellum moins développé (que chez les Pentatomidae) n'atteignant pas la moitié de l'abdomen.
- Cuneus présent sur l'hémélytre : membrane avec 1 ou 2 cellules fermées
- Habitus de taille 2 à 15 mm.

Figure 7: Illustration des critères permettant de décrire la famille des Miridae

Mon étude se porte donc sur deux grosses familles d'Hémiptères. Les Pentatomidae rassemblent 4937 espèces (Streito et Germain, sous presse) et les Miridae 11130 (Streito et Germain, sous presse). A l'intérieur de chaque famille, la phylogénie n'est pas stable.

Chaque modèle d'étude fera l'objet d'un chapitre dans mon mémoire.

C/ Matériel et Méthodes

Ce chapitre présente les méthodes et techniques qui ont été appliquées aux deux modèles d'études. Les méthodes spécifiques à un seul des deux modèles seront exposées dans les chapitres concernés. Pour la suite de mon mémoire, j'utiliserai la nomenclature du catalogue des hétéroptères de la région paléarctique (Kerzhner et Josifov, 1999 ; Rider, 2006 ; Aukema et al., 2013). Ainsi, je ne mettrai pas les références bibliographiques correspondant aux descriptions des taxons. Celles-ci sont

toutes référencées dans ces deux catalogues : Kerzhner et Josifov, (1999) pour les miridés et Rider, (2006) pour les pentatomidés.

1- Matériel Biologique

J'ai recensé l'ensemble des spécimens (*Eurydema* et *Lygus*) disponibles dans les collections du CBGP ainsi que des spécimens proches morphologiquement. Pour chaque genre, j'ai également listé les genres frères susceptibles de servir d'outgroup.

Ainsi, après avoir répertorié les espèces utiles à mes études, j'ai regroupé le matériel biologique disponible au sein du laboratoire. Plusieurs missions sur le terrain ont été organisées pour chercher les espèces manquantes. Elles ont permis d'enrichir notre jeu de données. Des collaborateurs ont également fourni des spécimens provenant de différentes localités permettant ainsi de mieux évaluer la variabilité intraspécifique.

Pour les *Eurydema*, il manquait notamment des espèces comme *E. dominulus*, *E. cyanea*, *E. fieberi* et *E. sea*. Des missions sur les monts Ventoux et Canigou ont été organisées sur une ou plusieurs journées pour récolter ces espèces manquantes ou insuffisamment représentées. Plusieurs espèces comme *E. sea*, nous ont été fournies par des collaborateurs. Ces efforts m'ont finalement permis d'étudier 13 espèces (voir annexe 1).

En ce qui concerne le genre *Lygus*, l'ensemble des espèces que je souhaitais étudier (toutes les espèces connues de France et d'Europe occidentale), se trouvait au laboratoire mais très rapidement, je me suis focalisée sur l'étude des spécimens mâles dont l'identification semblait plus fiable. Au CBGP, beaucoup de lots de ce genre ne contenaient pas de mâles. J'ai donc fait appel aux partenaires du projet IMPULSe pour récolter des représentants de *Lygus* en grand nombre et dans différentes localités. De ce fait, le CTIFL de Balandran (30) a fourni une grande partie des échantillons étudiés des espèces *L. pratensis* et *L. gemellatus*, deux espèces que l'on trouve en très grand nombre dans les cultures légumières. J'ai aussi récolté et étudié des échantillons de diverses localités et appartenant aux 7 espèces françaises. J'ai complété mon échantillonnage par quatre espèces de *Lygus* d'Amérique du Nord qui étaient disponibles dans nos collections ou récoltées par moi-même au cours d'une mission en Californie pour le projet Qbol (2015).

Pour chaque modèle biologique, un tableau recensant les numéros des individus et espèces étudiés est disponible en annexe (annexe 1 pour *Eurydema* et tableau 1, annexe 2 pour *Lygus*).

2- Études morphologiques

2-1- Identification du matériel biologique

Les spécimens ont été identifiés morphologiquement grâce aux clés de détermination qui font référence : Lupoli et Dusoulier (2015) et Derjanschi et Péricart (2005) pour les *Eurydema* ; Wagner et

Weber (1964) pour les *Lygus* français et Schwartz et Footitt (1998) pour les *Lygus* récoltés aux USA. Toutes mes identifications ont été vérifiées par J.-C. Streito spécialiste des hétéroptères.

2-2- Dissection des pièces génitales

Pour confirmer ou aider les identifications, des dissections de pièces génitales ont été nécessaires. Ces pièces génitales se situent dans les derniers segments abdominaux de l'insecte aussi bien pour les mâles que pour les femelles.

Pour visualiser les pièces génitales, les derniers segments abdominaux sont prélevés et mis à éclaircir dans un bain de potasse à 10% chauffé entre 70° et 90°C pendant 10 minutes environ. Cette étape dissout les muscles et les graisses ce qui permet de détacher et de bien voir les parties sclérifiées qui nous intéressent et demeurent intactes. Une fois que le bain de potasse est bien refroidi, l'échantillon est rincé dans un bain d'eau distillée pendant 1h environ. La dissection et l'observation sont réalisées dans une goutte de glycérine, sous une loupe binoculaire Stéréomicroscope Leica MZ12.5. Seules les pièces génitales importantes pour la caractérisation sont conservées : le pénis et les paramères pour les individus mâles ainsi que le spicule pour les *Lygus*, le vagin (*Lygus*) ou la spermathèque (*Eurydema*) pour les individus femelles. Après observation, les genitalia sont conservés dans la glycérine, dans un microtube épinglé avec le spécimen (Figure 8).



Figure 8 : illustration de la conservation des pièces génitales et des échantillons

Pour compléter cette étude des caractères morphologiques, des mesures de la forme générale des insectes ont été réalisées. Les spécimens ont été photographiés avec le système de prise de vues multi focus KEYENCE VHX5000, dans l'unité d'acquisition d'images numériques du CBGP.

2-3- Photographie des spécimens

Des photographies à la fois des spécimens et de leurs pièces génitales ont été prises afin de compléter la base de données Arthemis Db@se du laboratoire. Ces photos m'ont permis également d'étudier certains caractères difficiles en permettant une comparaison plus facile entre spécimens. Enfin elles sont à la base des études morphométriques que j'ai faites sur les deux modèles. Toutes les photographies ont été réalisées sur l'appareil KEYENCE VHX5000 soit avec un objectif VH-Z100 R/W/T dont la lentille grossit de 100 à 1000 fois (pour les détails morphologiques), soit avec l'objectif VH-20 R/W/T dont la lentille grossit de 20 à 200 fois (pour les spécimens de grosse taille comme les

Eurydema). Cet appareil a également été utilisé pour photographier les pièces génitales, notamment les spicules chez les *Lygus*. Dans ce cas, les organes disséqués sont photographiés dans la glycérine et grâce à l'éclairage diascopique de l'appareil. Cet appareil est étalonné et permet la prise de mesures, ainsi que l'affichage de l'échelle (qui a été systématiquement placée sur les clichés).

3- Études morphométriques

La morphométrie bénéficie depuis quelques années d'une série d'innovations méthodologiques importantes. Jusqu'alors les études morphométriques étaient basées sur l'application de méthodes statistiques multivariées à un ensemble de variables correspondant généralement à de simples distances linéaires (longueur, largeur, hauteur...) ou à des rapports entre ces distances. Ce type d'approche, appelé couramment morphométrie traditionnelle souffre cependant de plusieurs inconvénients (Rohlf et Marcus, 1993 ; Adams et al., 2004), le plus important étant probablement l'impossibilité de considérer la forme de l'objet étudié. Les méthodes de morphométrie géométrique constituent une avancée notable dans l'études des variations de forme (Bookstein, 1991). La nature des données est différente car il s'agit de coordonnées d'un ensemble de points. Ces méthodes permettent ainsi l'étude de formes très complexes, où la taille et la forme peuvent être considérées indépendamment. En morphométrie géométrique, deux grandes catégories de méthodes sont utilisées en fonction des données brutes décrivant la forme : analyses à l'aide de points homologues (Landmarks) et les analyses de contour.

J'ai ainsi réalisé une analyse à l'aide de points homologues (analyse procruste) sur les deux genres, ainsi qu'une analyse sur le contour (Transformées de Fourier) sur le modèle *Lygus* uniquement.

3.1-Photographie des spécimens

Quelle que soit la technique, les insectes entiers ou les détails morphologiques à étudier sont d'abord photographiés comme explicité au paragraphe précédent. J'ai veillé à ce que tous les spécimens soient orientés exactement de la même façon par rapport à l'appareil. Un mauvais positionnement est source potentielle d'erreur et de biais important dans les analyses morphométriques subséquentes.

Les photographies ont ensuite été travaillées et mises en forme avec le logiciel Adobe Photoshop CS6 selon le protocole présenté en annexe 3, d'une part pour servir aux illustrations de la base et ensuite pour être homogènes en vue des analyses morphométriques ultérieures. Pour certaines photographies, une réorientation a été nécessaire pour obtenir une symétrie bilatérale de l'insecte à partir d'un repère vertical. Pour les photographies utilisées pour les études de contour, seules les parties étudiées ont été sélectionnées et mises à part.

3-2-Analyses morphométriques

3-2-1-Méthodes des points homologues : Méthode de superposition Procruste

Cette méthode de morphométrie appréhende la morphologie des animaux indépendamment de leur taille (Bookstein, 1981, 1982) et permet donc de pallier les inconvénients liés à ce paramètre taille. Il s'agit d'une approche de morphométrie géométrique qui analyse une configuration de points repères qui sont *a priori* considérés comme résumant la forme de l'objet biologique étudié. Dans mon travail, il sera essentiellement question de la méthode de superposition Procruste qui dissocie la forme d'un objet en ses composantes de taille et de conformation (Adams et al., 2004). Pour cette étude des points homologues (points repères ou landmarks), l'emplacement des points a été déterminé en fonction des questions biologiques et de manière à utiliser le maximum de photographies pour avoir une bonne représentation statistique. J'ai fait un compromis entre avoir un grand nombre de points et pouvoir les positionner sans trop d'erreur de placement.

La superposition Procruste a pour objectif premier de rendre possible la comparaison de deux objets. L'exemple le plus didactique est celui de la comparaison de triangles (voir Figure 9) qui diffèrent par leur taille, leur position et leur orientation. Pour réaliser cette comparaison, l'information de forme doit être résumée à l'aide de points repères (Figure 9). Dans le cadre d'objets biologiques, ces points sont souvent dit « homologues », c'est-à-dire qu'ils doivent être positionnés, chez deux individus d'espèces différentes, à des positions structurellement identiques. La notion d'homologie est ici relâchée par rapport à sa signification biologique où le caractère homologue de filiation (Lecointre et Le Guyader, 2009) est un caractère partagé par les descendants qui l'héritent de leur ancêtre commun. Ces points homologues peuvent être catégorisés en fonction de la manière dont ils sont reconnus anatomiquement.

Dans ce travail, les coordonnées des points sont numérisées à partir de photographies numériques donc en deux dimensions. La position relative des points homologues a la propriété de rester inchangée après des transformations telles que la translation, la mise à l'échelle et la rotation. Ce sont ces propriétés qui vont être utilisées lors de la superposition Procruste en vue de la comparaison de deux formes. Une fois la superposition réalisée, les comparaisons d'individus se font au travers d'analyses statistiques plus classiques, restant néanmoins dédiées à l'analyse des formes. Bookstein (1991) a défini trois types de points homologues, suivant l'information biologique qu'ils portent. Les points homologues de type 1 sont positionnés sur des juxtapositions discrètes de tissus (par exemple : croisement de sutures entre des plaques osseuses) et sont les seuls points homologues qui représentent de réelles homologies structurales. Les points homologues de type 2 sont localisés sur des maximums de courbures. Ils correspondent à des similarités développementales entre individus mais leur valeur en termes d'homologies est plus faible que pour ceux de type 1. Enfin, les points homologues de type 3 sont nommés pseudo-points homologues ou points homologues flous par Bookstein car ils résultent d'une construction géométrique à partir des deux types précédents. Pour Bookstein (1991) les points homologues de type 1 doivent être considérés en priorité par rapport aux deux autres types.

La superposition Procruste se déroule en trois étapes : la translation, la mise à l'échelle et la rotation.

Pour résumer, la superposition Procruste décompose la forme des objets en :

- une variable synthétique de taille, la taille centroïde,
- une conformation définie par les coordonnées des points homologues superposés.

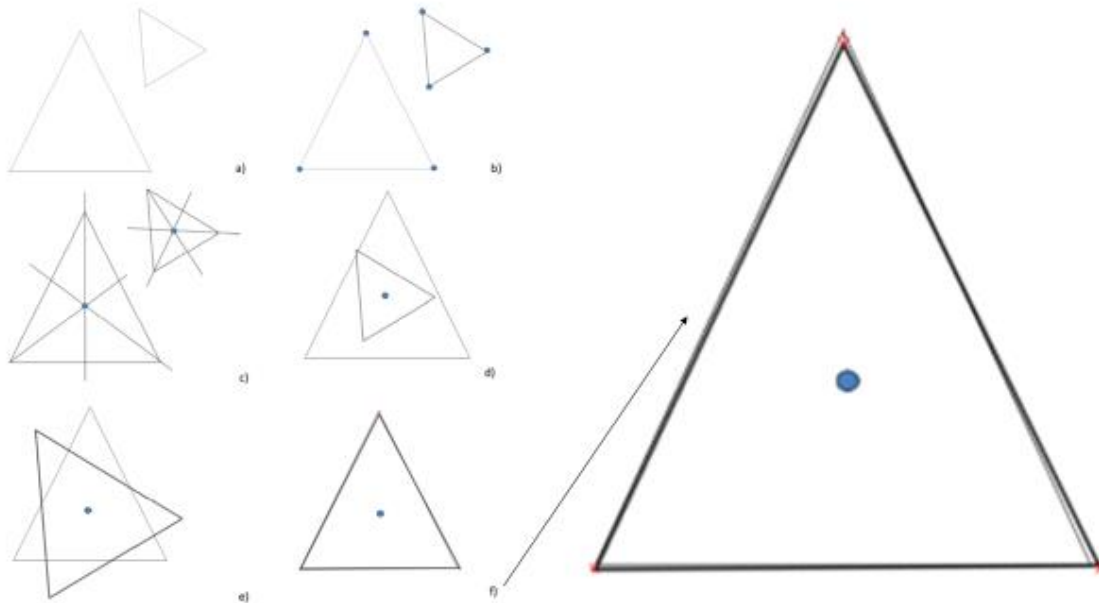


Figure 9 : Les étapes de la superposition Procruste (a) l'objectif est de comparer deux objets qui diffèrent par leur position, leur orientation et leur taille. (b) L'information est résumée par un ensemble de points homologues (points bleus). (c) Le centre de gravité des figures est calculé (d) une Translation permet de faire correspondre les centres de gravité des formes (e) une mise à l'échelle permet de séparer la variable de taille et celle de conformation (f) Enfin une rotation permet de faire correspondre les conformations par un ajustement au moindre carré. Les flèches rouges représentent les différences entre conformations.

Dans ce type d'analyse, l'estimation de l'erreur de mesure est un point central à évaluer avant de pouvoir échanger des données entre morphométriciens ou produire un outil d'identification utilisable par des opérateurs divers (Dujardin et al., 2010). Une réflexion sur l'appréciation de l'erreur et sa réduction est donc un travail préalable à toute production de jeux de données morphométriques. L'erreur de mesure se caractérise par un écart à la valeur réelle de la quantité mesurée (Rabinovich, 2005). Cet écart peut provenir de plusieurs facteurs et peut être divisé en trois composantes : la précision, l'erreur stochastique et l'erreur systématique (Arnqvist et Martensson, 1998 ; Rabinovich, 2005). La précision, pour un opérateur donné, est influencée par les outils de mesures qu'il utilise qui conditionnent sa capacité à placer les points repère sur les différentes photographies au moment de la digitalisation des points. Les sources d'erreurs stochastiques surviennent de façon omniprésente (Arnqvist et Martensson, 1998) entre plusieurs individus mesurés et influencent la reproductibilité des mesures. Les conditions de préparation des spécimens influencent la forme d'un objet biologique et sont donc individu-dépendant (augmentation de la variance inter-individus) et représentent une autre source d'erreur. Celle-ci peut devenir systématique si la variation induite est toujours la même d'un individu à l'autre.

Pour la méthode d'analyse Procruste, j'ai utilisé les scripts R des packages « geomorph » et « stereomorph » (annexe 4).

3-2-2- Méthode d'analyse de contour (analyse de transformée de Fourier)

Cette seconde méthode sera abordée plus en détail lors de l'utilisation sur le modèle étudié. Mais le principe général repose sur 2 notions :

-la somme de signaux sinusoïdaux de périodes différentes engendre un signal irrégulier (non sinusoïdal (exemple : Figures 10a et b)

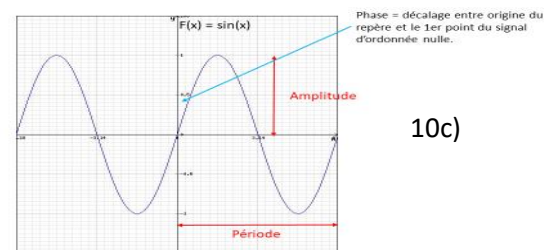
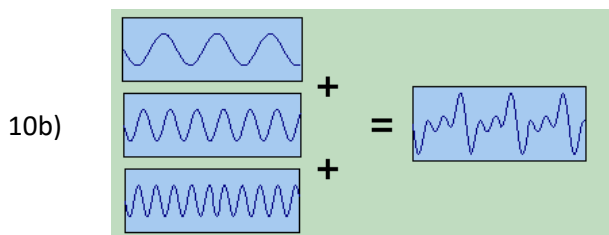
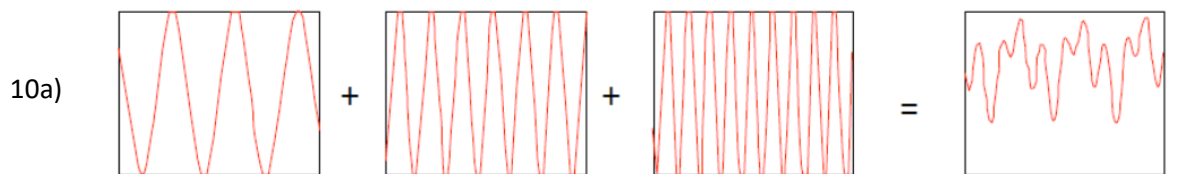


Figure 10 a et b : exemples de somme de signaux sinusoïdaux de périodes différentes permettant l'obtention d'un signal.

Figure 10c: description des différents paramètres permettant d'étudier une fonction sinusoïde.

- les paramètres (amplitude, période, phase) de tous les éléments d'une série de signaux sinusoïdaux permettent de décrire n'importe quelle fonction périodique (Figure 10c).

L'application des transformées de Fourier permet ensuite de décomposer un contour en une somme de fonctions trigonométriques de longueurs d'ondes décroissantes appelées harmoniques (Figure 11).

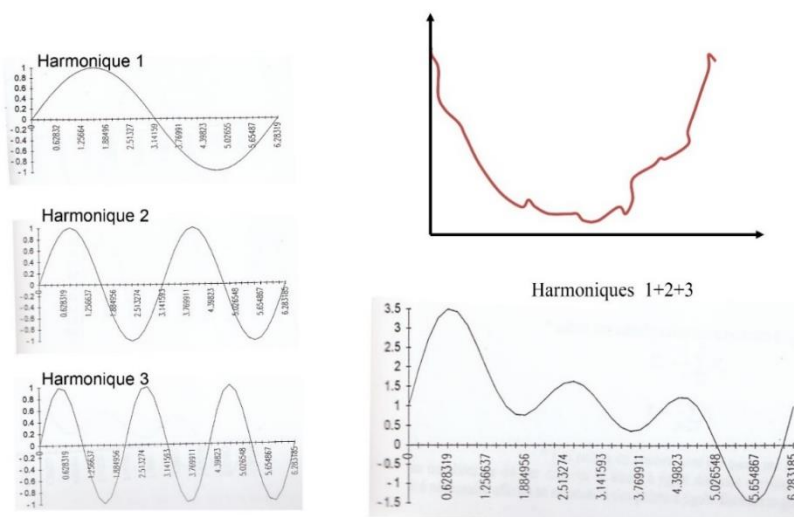


Figure 11 : décomposition d'un signal en haut à droite en trois harmoniques et somme de celles-ci (en bas à droite).

Cette méthode appliquée sur le modèle *Lygus* sera plus détaillée lors de son analyse. J'ai utilisé un script écrit sous R (package « momocs ») en annexe 5.

4- Méthodes moléculaires

4-1-Séquençage du code-barres standard COI (Hebert et al., 2003)

La première analyse moléculaire a été effectuée avec le fragment en 3' de 658pb du gène de la Cytochrome Oxydase I (COI), gène universel, assez variable pour différencier les espèces entre elles tout en permettant de définir des amorces relativement « universelles » et donc d'amplifier des séquences comparables chez des taxons même relativement éloignés (familles voire ordres : Hebert et al., 2003).

4-1-1-Extraction non destructive de l'ADN

Les insectes entiers sont déposés dans une plaque d'extraction et l'ADN est extrait selon les instructions du kit d'extraction Qiagen (DNeasy Blood & Tissue Kit). La digestion se fait pendant une nuit dans un volume de 200µL de tampon ATL et 20µL de protéinase K. L'élution des ADN se fait dans un volume de 100µL au total (2 fois 50µL de tampon AE). Cette méthode est non destructive et le spécimen extrait (voucher) est reconditionné en alcool 96% puis archivé et conservé sur le plateau technique « Collections » du CBGP. Cette étape est fondamentale pour mon travail : elle m'a permis chaque fois que nécessaire (non concordance entre les identifications morphologiques et moléculaires) une nouvelle observation morphologique des « vouchers » y compris des pièces génitales. Celles-ci n'étant pas endommagées par l'extraction, il est en effet possible de les étudier après extraction de l'ADN du spécimen concerné. J'ai procédé de deux façons : soit les pièces génitales sont détachées avant l'extraction de l'ADN et sont étudiées comme précisé précédemment ; soit elles ne sont pas retirées et sont étudiées si nécessaire après l'extraction de l'ADN.

4-1-2-Amplification et séquençage

L'amplification du fragment COI est faite de deux manières en fonction de la technique de séquençage utilisée : Sanger ou haut débit. Je choisis l'une ou l'autre des techniques en fonction du nombre d'échantillons à traiter : le séquençage Sanger est privilégié lorsque le nombre d'échantillons est assez faible ; le haut débit est moins coûteux lorsque le nombre d'échantillons dépasse 300.

Pour le séquençage Sanger :

Le mix PCR est préparé dans un volume final de 25µL (par tube) à partir de Tampon DreamTaq (10X) (ThermoScientific) à la concentration 1X, qui contient du MgCl₂ qui est un cofacteur de la Taq polymérase. Le mix doit contenir également 0,1mM de dNTP nécessaires à l'élongation de la chaîne à partir d'une solution à 2,5mM, 0,2 µM de chaque primer Forward (F) et Reverse (R) à partir de solution à 10µM afin de fixer la Taq, et enfin, 0,625 U/tube de Taq polymérase DreamTaq (ThermoScientific) à partir d'une solution à 5U/µL. Cette enzyme est nécessaire à l'élongation de la chaîne nucléotidique.

Cette Taq polymérase est thermorésistante, modifiée pour générer une amplification robuste, et d'une meilleure sensibilité comparée à une Taq polymérase classique. Le programme de PCR comprend une période de dénaturation initiale de 2 min à 94°C puis 5 cycles de « dénaturation pendant 30 sec à 94°C, hybridation pendant 40 sec à 45°C, et élongation pendant 1 min à 72°C ». Ensuite on retrouve 35 cycles identiques aux précédents, à la seule différence que la température d'hybridation n'est plus de 45°C mais de 51°C, et enfin on procède à une élongation finale à 72°C pendant 10 min.

Les amorces (*primers*) utilisées sont un cocktail d'amorces composé de plusieurs amorces F et R (LCO_puc+Hem1t / HCO_puc+Hem1t+Hem2t), possédant toutes une queue M13, qui facilite ensuite le séquençage. En effet, le séquençage se fera avec les amorces M13F et M13R qui sont en gras dans la séquence des primers utilisés qui sont résumés dans le tableau 1.

Tableau 1 : Liste des séquences des amorces utilisées pour amplifier le fragment code-barres COI.

Nom de l'amorce	Séquence 5' – 3' de l'amorce
Forward	
LCO1490puc_t1	TGTA AAAACGACGGCCAGTTTTCAACWAATCATAAAGATATTGG
LCO1490Hem1_t1	TGTA AAAACGACGGCCAGTTTTCAACTAAYCATAARGATATYGG
Reverse	
HCO2198puc_t1	CAGG AAACAGCTATGACTAAACTTCWGGRTGWCCAAARAATCA
HCO2198Hem2_t1	CAGG AAACAGCTATGACTAAACYTCAGGATGACCAAAAAAYCA
HCO2198Hem1_t1	CAGG AAACAGCTATGACTAAACYTCDGGATGBCCAAARAATCA

Une fois les amplifications effectuées, celles-ci sont envoyées à séquencer à MWG Eurofins Genomics qui est un de nos prestataires de service de séquençage. Ce prestataire nous renvoie les séquences brutes et pour chaque échantillon, nous avons une séquence « sens » (*forward*) et une séquence « antisens » (*reverse*). Pour les corriger et vérifier leur intégrité, j'utilise le logiciel Geneious R8 qui me permet de concaténer les deux fragments, de vérifier que toutes les bases concordent et ainsi de former une séquence consensus.

Ensuite, la séquence est traduite en acides aminés ce qui permet de vérifier que la séquence consensus obtenue ne contient pas de codon stop, synonyme de l'obtention d'un pseudo-gène : au lieu de séquencer mon fragment d'intérêt, j'aurais amplifié et séquençé une copie nucléaire inactive, non fonctionnelle comportant soit des délétions ou des insertions soit des mutations engendrant un codon stop lors de la traduction. Une fois vérifiées, les séquences sont alignées pour éliminer celles qui seraient des contaminations. Cette étape est réalisée sur le site web Blast (Basic Local Alignment Search Tool), qui compare la séquence à tester avec celles disponibles dans la banque de séquences GenBank.

Pour le séquençage NGS double step PCR

La préparation de la librairie est effectuée selon un protocole de double step PCR (Cruaud et al., 2017) selon le schéma récapitulé à la figure 12. Ce protocole comporte deux amplifications (voir tableau

2 et annexe 2 tableau 3 pour les amorces utilisées) pour obtenir le fragment code-barres de 658 pb. Le fragment d'intérêt est décomposé et séquencé en deux parties car les séquenceurs nouvelle génération ne produisent que des séquences courtes de 300pb au maximum (Figure 13).

L'ADN extrait est donc amplifié en deux fragments (FC et BR : Figure 13), tout d'abord à l'aide des amorces de la première PCR (amorce de séquençage – amorce spécifique). Le cycle PCR dépend des amorces spécifiques utilisées, tel que résumé dans le tableau 2 (soit l'amplification du fragment FC soit le fragment BR). Il faut ajouter, en début de cycle, une étape initiale de 15 min à 95°C pour activer la HotStartTaq DNA Polymerase du kit Multiplex (Qiagen) et une étape finale d'élongation de 5min à 72°C.

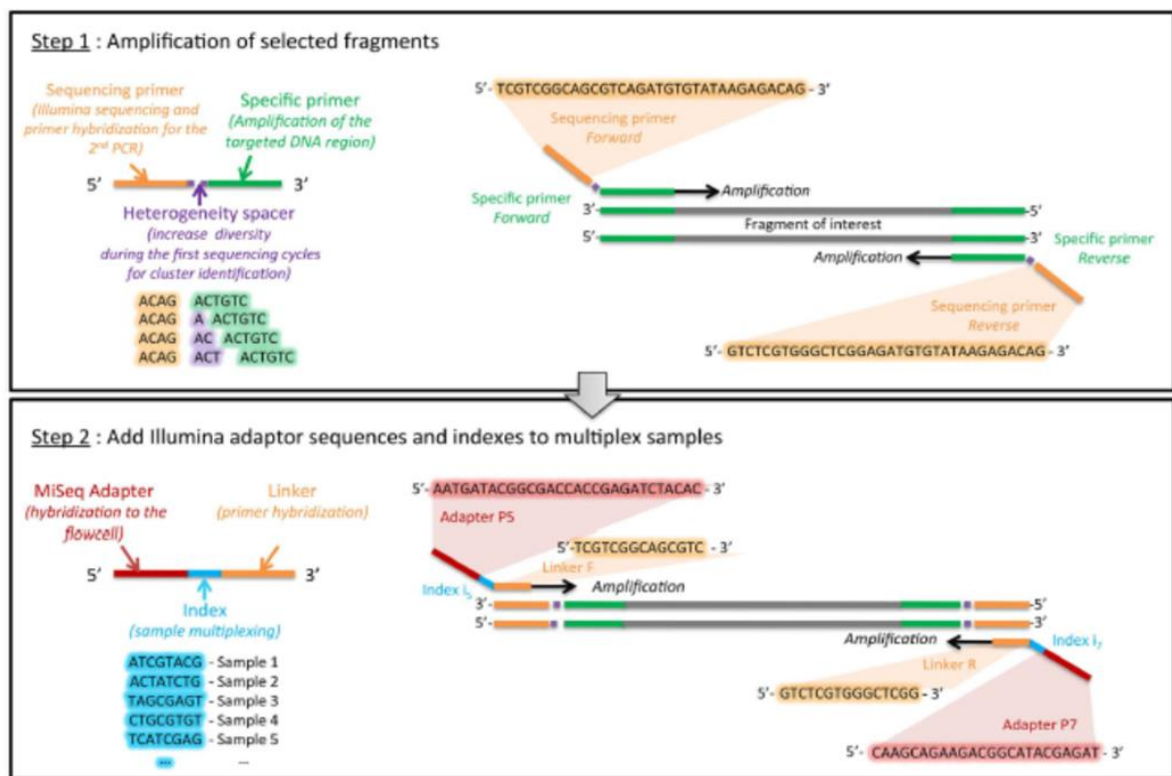


Figure 12 : Illustration de l'approche two-step PCR (Cruaud et al., 2017).



Figure. 13: découpage du fragment d'intérêt COI en deux fragments

Tableau 2 : Liste des séquences des amorces et cycles d'amplification en fonction des fragments FC ou BR (gène COI)

Nom de l'amorce	Séquence 3' – 5' de l'amorce	Publication	Cycle d'amplification
Fragment FC			
LCO1490	TTTCAACWAATCATAAAGATATTGG	Folmer et al. (1994)	35X
III_C_R	GGIGGRTAIACIGTTCAICC	Shokralla et al. (2015)	94°C 40sec, 48°C 1min et 72°C pendant 30sec
Fragment BR			
III_B_F	CCIGAYATRGCITYCCICG	Shokralla et al. (2015)	35X 94°C 40sec, 46°C
HCO2198	TAAACTTCAGGGTGACCAAAAAATCA	Folmer et al. (1994)	1min et 72°C pendant 30sec

Pour faciliter le séquençage, les amorces de cette première PCR sont également déphasées, c'est-à-dire que l'on ajoute une, deux ou trois bases pour avoir un décalage dans le cadre de lecture du séquenceur. Le tableau 3 en annexe 2 donne la liste complète des amorces déphasées.

Pour vérifier l'amplification du fragment d'intérêt (FC ou BR), on réalise une migration de 3µL de produits de PCR sur un gel d'agarose 1,5% sur 100V pendant 30 min à côté d'un marqueur de taille standard. Une photo du gel sous UV est prise pour s'assurer qu'une bande apparaît pour chaque puits.

Les résultats de la première amplification (amplicons) vont ensuite être de nouveau amplifiés. Les primers utilisés pour cette seconde PCR comportent (de 5' en 3'), un adaptateur (P5 ou P7) qui permet l'hybridation des amplicons sur la cellule de séquençage MiSeq, un index de 8 nucléotides (i), qui permet d'indexer les échantillons, et une partie de la séquence du primer de séquençage qui va permettre l'hybridation sur les amplicons produits lors de la 1^{ère} PCR. Pour la PCR2, le volume total pour une réaction est de 10 µL avec 5 µL de kit Multiplex (QIAGEN), 2 µL d'amorce = index i 5 (3.5 µM initial), 2 µL d'amorce = index i 7 (3.5 µM initial) et 1 µL de produit de PCR1. Le cycle PCR est le même pour toutes les plaques. Il comporte : une étape initiale de 15 min à 95°C pour activer la HotStarTaq DNA Polymerase du kit Multiplex (Qiagen), puis 5 cycles comportant une étape de dénaturation à 95°C (40 s), une étape d'hybridation à 55°C (45 s) et une étape d'élongation à 72°C (60 s), et enfin une étape finale à 72°C (10 min).

Pour s'assurer que l'amplification a bien fonctionné, une migration sur gel d'agarose 1,5% à 100V pendant 30 min à côté d'un marqueur de taille standard est effectuée avant de prendre une photo du gel sous UV et de s'assurer de la présence de bandes à la bonne taille (plus longues que lors de la 1^{ère} PCR).

La préparation des échantillons pour le séquençage comporte 2 étapes de regroupement (Pool). Une première étape consiste à mélanger tous les échantillons, chaque fragment indépendamment. Ce mélange

doit être réalisé après la 2^{ème} PCR et avant purification. La 2^{ème} étape de mélange consiste ensuite à combiner ces premiers « sous-pools » en un seul et doit être réalisée après purification.

Après la seconde PCR et pour chaque fragment indépendamment, les différents échantillons doivent être mélangés volume à volume. On prélève ainsi 3 µL de chaque puits et on les regroupe dans un tube Eppendorf de 1,5 ou 2 ml selon le besoin. Les « sous-pools » doivent ensuite être purifiés sur gel avec le kit PCR Clean-up Gel extraction (Macherey-Nagel). Après les avoir mélangés, on dépose 100 µL de chaque tube, dans des puits élargis sur un gel d'agarose 1,2%. On fait migrer 1h30 à 100V puis on découpe la bande d'intérêt au scalpel stérile sur la plaque UV et on la met dans un Eppendorf (en coupant la bande au plus près pour ne pas avoir trop de gel). Le protocole du fournisseur est suivi ensuite.

Les « sous-pools » ainsi purifiés sont ensuite quantifiés. Une mesure avec un appareil Qubit (Qubit Fluorometric Quantification ; Thermo Fisher Scientific) est effectuée avant de préparer une puce Bioanalyseur DNA 1000 (Agilent) qui permet ainsi de connaître la concentration approximative d'ADN contenu dans les sous-pools et de choisir les deux dilutions appropriées pour préparer une quantification par PCR quantitative grâce au kit KAPA Library Quantification pour plateforme de séquençage Illumina®. Tous les « sous-pools » doivent être quantifiés en deux dilutions différentes et en trois exemplaires (triplicats).

Tous les sous-pools sont ensuite regroupés en un pool unique. Les proportions des différents sous-pools doivent être évaluées en fonction du nombre d'amplicons estimé par Q-PCR. Ainsi, le volume utilisé pour chacun des sous-pools sera calculé afin d'obtenir une proportion équivalente d'amplicons pour chacun des fragments. Le pool issu du second regroupement peut être envoyé à la plateforme de séquençage, en indiquant la concentration d'ADN mesurée dans ce dernier.

4-1-3-Analyse des runs de séquençage

Une fois le séquençage effectué, des milliers de séquences brutes sont à analyser. Le nettoyage des séquences ne peut pas se faire individuellement comme avec les séquences issues du séquençage Sanger. Il faut traiter l'ensemble des données brutes avec un processus de bio-informatique sous Linux. Pour ce faire, j'ai suivi un pipeline bio-informatique sous Linux (Cruaud et al., 2017 ; Haran et al., 2018) dont la première étape consiste en un contrôle qualité des données brutes. Les fragments BR et FC sont traités séparément et assemblés seulement en fin de traitement. Afin d'éviter la conservation de chimères (recombinaisons de fragments non apparentés) dans le jeu de données, les amorces situées de part et d'autre de la séquence sont vérifiées, puis retirées pour ne conserver que le fragment d'intérêt. Les séquences inférieures à 200 bp sont ensuite supprimées. Pour chaque spécimen une multitude de séquences est obtenue. Les séquences parfaitement identiques sont regroupées, et comparées les unes aux autres pour former des groupes (appelés « swarm ») dont les séquences divergent au maximum d'une paire de bases. Les groupements contenant moins de 10 séquences sont retirés ainsi que les séquences contenant des gaps non multiples de 3 (non codants). La dernière étape de traitement bio-

informatique concerne la reconstitution du gène complet à partir des deux fragments. Les séquences complètes sont alignées grâce au programme MUSCLE, dans le logiciel Geneious® et traduites selon le code génétique mitochondrial des invertébrés. L'identification du cadre de lecture permet la recherche des codons stops (indicateurs de pseudo-gènes) non détectés par le contrôle qualité, et ces séquences sont supprimées. Une observation méticuleuse des séquences permet de déceler les plus aberrantes (variation de nombreux nucléotides), lesquelles sont ensuite comparées aux séquences de la base GenBank avec BLAST et éliminées si elles ne concernent pas les groupes étudiés (contaminations par symbiotes ou dues aux manipulations).

4-1-4-Contrôle qualité et validation des séquences

Qu'elles aient été produites par la méthode Sanger ou séquençage haut débit les séquences obtenues sont contrôlées et validées grâce à un protocole qualité propre au laboratoire. L'originalité de cette démarche est l'alternance d'identifications moléculaires et morphologiques jusqu'à obtention d'un consensus entre les deux méthodes. Ce protocole ne peut être mis en œuvre que grâce à l'extraction non destructive de l'ADN et à l'archivage rigoureux d'un voucher en bon état de conservation pour chaque séquence produite. J'utilise ce protocole en routine au laboratoire et je l'ai mis en œuvre tout au long de mon travail EPHE. À l'issue de ces contrôles, toutes les séquences, quelle que soit la technique de séquençage sont de qualité équivalente et réunies indifféremment pour être analysées de manière identique.

4-2-Séquençage des autres gènes d'intérêts

Pour les deux modèles (*Lygus* et *Eurydema*), le fragment code-barres COI n'a pas été suffisant pour identifier correctement et sûrement mes échantillons. J'ai donc cherché d'autres gènes d'intérêt.

J'ai sélectionné un fragment du gène mitochondrial Cytochrome b (Cytb) qui code pour une sous-unité d'un complexe de protéines transmembranaires de la chaîne respiratoire (Jermiin et Crozier, 1994). Ce gène permet de déterminer les relations au niveau des clades terminaux et donc de décrire l'évolution récente. Un fragment de 434pb a été sélectionné en fonction des résultats préliminaires. Les conditions et les amorces d'amplification sont résumées dans le tableau 3.

Je me suis également intéressée à un autre gène mitochondrial : le ND5 souvent utilisé dans des études chinoises sur des *Lygus pratensis*, ce qui peut me permettre de comparer mes données avec des données déjà publiées (Zhang et al., 2017 ; Wang et al., 2017). La protéine ND5 est une sous-unité de la NADH déshydrogénase (ubiquinone), qui est située dans la membrane interne de la mitochondrie et qui est le plus grand des cinq complexes de la chaîne de transport des électrons. Sur deux tests effectués avec des couples d'amorces différents, le fragment le plus grand (744pb) a été étudié par la suite sur l'ensemble des échantillons. Ce fragment de gène n'a été séquencé que pour le modèle *Lygus*.

Les gènes COI, Cytb et ND5 étant mitochondriaux et donc soumis à l'introgession du fait de leur héritage maternel, j'ai également recherché des gènes nucléaires. En me basant sur différentes études (Roehrdanz et Wichmann, 2014 ; Ji et al., 2003 ; Cryan et Urban, 2012 ; Jung et Lee, 2012), le domaine D2 de la région 28S ribosomique (ARNr) et les espaceurs internes transcrits (ITS) se sont révélés adaptés pour la caractérisation d'espèces. Aussi, j'ai sélectionné des amorces (voir tableau 3) pour séquencer ces deux gènes nucléaires chez un certain nombre de spécimens de mes deux modèles

Les domaines transcrits de l'ADN ribosomique et le domaine D2 présentent un faible taux de polymorphisme entre espèces, ce qui permet des comparaisons entre un petit nombre d'individus en vue d'établir leur parenté phylogénétique. Les ITS ont un taux de mutations sensiblement plus élevé sous l'effet d'insertions, de délétions et de mutations ponctuelles, ce qui rend inopérante la comparaison de séquences d'ITS entre espèces très éloignées. Il est toutefois possible de mener avec succès des analyses phylogénétiques entre espèces voisines en incluant les ITS (ce qui d'après mes premiers résultats semblait être le cas pour mes deux modèles). En revanche, l'analyse des régions transcrites de l'ADN ribosomique permet de réaliser sans problème de telles études car ces séquences évoluent bien plus lentement. Plusieurs publications ont recours à ces fragments de gènes (Wang et al., 2013, 2014 ; Zhao et al., 2013 ; Kapantaidaki et al., 2019)

Tableau 3 : Liste des amorces et conditions d'amplification des différents fragments pour les quatre gènes sélectionnés.

	Amorces	Publications	Conditions amplifications
Cytb 434pb	CB1 -> TATGTACTACCATGAGGACAAATATC CB2 -> ATTACACCTCCTAATTTATTAGGAAT	Jermiin et Crozier 1994	94°C 2min, 35 cycles à 98°C 10 sec, 48°C 30sec, 72°C 1min. 72°C 10 min
ND5 744pb	ND5F-> AACATAATTACCTGAACCCATGAA ND5R -> TCTTCAACTTTAGTAACTGCAGGAG	Zhang et al. 2017	94°C 2min, 35 cycles à (98°C 10 sec, 56°C 30sec, 72°C 1min.) 72°C 10 min
ITS 680pb pour <i>Eurydema</i> 1058pb pour <i>Lygus</i>	CASp8sFcM-> CGAACATCGACAAGTCGAACGCACA CAS28sB1d-> TTCTTTTCTCCSCTTAYTRATATGCTTAA	Ji et al. 2003	94°C 2min, 35 cycles à 98°C 10 sec, 52°C 1min, 72°C 1min30sec. 72°C 10 min
28s D2 (pour <i>Lygus</i>) 709pb	28SFor -> AAGAGAGAGTTCAAGAGTACGTG 28SRev -> TAGTTCACCATCTTCGGGTCCC	Roehrdanz et al 2015	94°C 2min, 35 cycles à 98°C 10 sec, 58°C 1min, 72°C 1min. 72°C 10 min
28S D2 (pour <i>Eurydema</i>) 605pb	28S-D2CF -> CGTGTGCTTGATAGTGCAGC 28S-D2CR -> TTGGTCCGTGTTCAAGACGGG	Heraty et al., 2004	94°C 3min, 35 cycles à 98°C 10 sec, 52°C 1min, 72°C 1min. 72°C 10 min

Le séquençage de ces fragments a été effectué avec la méthode Sanger. Les séquences en découlant ont été nettoyées, corrigées et vérifiées selon le même protocole qu'énoncé précédemment pour le fragment COI. (Paragraphe : séquençage Sanger p.38).

4-3-Construction des arbres phylogénétiques

Une fois toutes les séquences corrigées et vérifiées, un alignement est effectué avec les paramètres par défaut de ClustalW (1.81) (Thomson et al., 1997) sous BioEdit 7.2.5 (Hall, 1999).

Un premier arbre construit avec la méthode du Neighbour-Joining (NJ) est réalisé ensuite sur cet alignement avec la distance de Kimura 2 paramètres (modèle d'évolution le plus couramment utilisé dans les différentes études de code-barre comme par exemple dans l'étude de Kim et Jung (2018)). Le Neighbour-Joining (1987) est une méthode de distance rapide de reconstruction d'arbre basée sur le principe du minimum d'évolution qui minimise à chaque étape la longueur totale des branches entre taxons voisins. Il existe plusieurs modèles évolutifs prenant en compte jusqu'à 10 paramètres pour quantifier les distances évolutives ; le taux de transitions entre purines et entre pyrimidines, le taux de transversions, ou les six taux de substitution entre les quatre nucléotides, combinés ou pas à l'inégalité des fréquences des nucléotides. Le modèle d'évolution K2P implique que les 4 bases ont la même fréquence et que les transversions et transitions ont un taux différent (d'où 2 paramètres pour chaque). Ces arbres en NJ sont rapides à obtenir et je les ai fait sous le logiciel MEGAX (Kumar et al., 2018) avec 1000 réplifications de bootstrap (méthode d'inférence statistique basée sur la réplification multiple des données à partir du jeu de données étudié, selon les techniques de ré-échantillonnage). Cela permet d'avoir un ordre d'idée de la robustesse des groupements obtenus et de pouvoir évaluer si ces groupes sont fiables ou pas en fonction de la valeur de bootstrap obtenue. Les clusters ont été considérés bien soutenus pour une valeur de bootstrap supérieure à 90% et notés sur les arbres quand la valeur était supérieure à 70%.

Ensuite, j'ai reconstruit un arbre en maximum de vraisemblance (ML pour Maximum Likelihood) sous CIPRES Science Gateway V. 3.3® (portail informatique d'inférence phylogénétique : Miller et al., 2012). Le modèle RAXML-HPC2 (Randomized Accelerated Maximum Likelihood) on XSEDE (basé sur le modèle d'évolution GTRGAMMA) a été utilisé en raison de ses performances et de la cohérence des résultats obtenus chez les arthropodes. Le logiciel recherche l'arbre dont la topologie est la plus vraisemblable étant donné les séquences étudiées et le modèle d'évolution (six types de substitution, fréquences des bases inégales et hétérogénéité des taux de substitution estimée à l'aide d'une loi gamma). La robustesse des nœuds de l'arbre a été évaluée avec 1000 réplifications de bootstrap.

L'édition des arbres a été réalisée grâce au logiciel Treedyn (version 198 <http://www.treedyn.org/>) pour les arbres reconstruits avec CIPRES ou avec MEGAX pour ceux issus des méthodes Neighbour Joining.

Dans mon mémoire, j'ai comparé les 2 types d'arbres (NJ et ML) et je n'ai présenté que celui en Maximum de Vraisemblance car les topologies étaient les mêmes et les valeurs de bootstraps similaires entre les deux méthodes de reconstruction.

4-4 Calcul des matrices de distances

Une matrice de distance a été calculée avec le logiciel MEGAX à partir de ces mêmes séquences alignées à l'aide du modèle Kimura 2 paramètres (K2P) avec l'option « pairwise deletion ». Ces données de distances génétiques sont présentées, pour chaque gène, dans des tableaux intra- et interspécifiques permettant de comparer, entre autres, les distances interspécifiques minimales et les distances intraspécifiques maximales.

4-5 Concaténation des séquences

Une fois les arbres analysés et comparés entre eux pour chaque gène séparément, nous avons concaténé les séquences des différents gènes pour réaliser des « super-alignements ». Ces super-alignements ont fait l'objet d'une nouvelle analyse afin de déterminer le meilleur modèle d'évolution ainsi que la meilleure partition. En effet, la meilleure façon de prendre en compte l'hétérogénéité du processus d'évolution entre les gènes (par exemple, gènes mitochondriaux *versus* gènes nucléaires) et entre les différentes partitions des gènes (par exemple : portions codantes *versus* non codantes ; positions synonymes *versus* non synonymes) est de partitionner les données d'alignement en groupant ensemble les données qui évoluent de la même façon. Les schémas de partition sélectionnés ont été déterminés à l'aide du logiciel Partitionfinder (Lanfear et al., 2016) et sont ensuite implémentés à l'analyse RaxML sous CIPRES.

J'ai donc concaténé ensemble dans un premier temps les gènes mitochondriaux, dans un second temps, les gènes nucléaires et ensuite, j'ai effectué une concaténation totale regroupant tous les gènes étudiés.

Je détaillerai davantage le matériel étudié, les spécificités dans le choix des gènes et des techniques utilisés pour chacun des modèles. En fonction des résultats trouvés, d'autres techniques et approches ont été nécessaires pour tenter de répondre aux questions posées. Celles-ci seront exposées également dans les chapitres consacrés à chaque modèle biologique pour lesquelles elles ont été nécessaires.

Chapitre II : Modèle Biologique n°1

Le genre *Eurydema* Laporte de Castelnau, 1833

A- Contexte général : Le genre *Eurydema*

Mon premier modèle d'étude sur des ravageurs de cultures légumières est un groupe de punaises reconnaissable par ses couleurs et par le fait qu'il est spécifique (à quelques exceptions près) de la famille de plantes cultivées des crucifères. Il s'agit des punaises du genre *Eurydema*.

1. Définition et diversité du genre *Eurydema*

Le genre *Eurydema* a été créé par Laporte en 1833 comme sous-genre de *Pentatoma* avant d'être élevé au statut de genre par Herrich-Schäffer (1835) (Rider, 2006). Il est à présent bien défini et ses contours ne sont plus discutés. Derjanschi et Péricart (2005) en donnent une diagnose détaillée. Le genre *Eurydema* est actuellement divisé en trois sous-genres *Eurydema*, *Rubrodorsalium* et *Horvatheurydema* dont la validité est toujours discutée (Derjanschi et Péricart, 2005). Les différentes espèces ont été réparties entre ces sous-genres (parfois de façon non satisfaisante) et six espèces asiatiques demeurent sans attribution (Rider, 2006 ; Aukema et al., 2013). Ces sous-genres sont définis sur la base de critères de coloration, de structure des genitalia mâles mais aussi d'anatomie interne (présence de spinules sur la surface interne du pronotum et du scutellum). Il est clair que certaines espèces sont mal positionnées notamment si on considère leur genitalia (Derjanschi et Péricart, 2005). En pratique, pour l'identification des espèces, personne ne tient compte de ces sous-genres notamment en raison de la confusion qui règne et de la difficulté d'observation des critères internes qui nécessitent la destruction du spécimen.

Le genre *Eurydema* essentiellement paléarctique puisque distribué de la Péninsule ibérique au Japon et débordant en Afrique du Nord comprend actuellement 33 espèces (Rider, 2015) dont 17 en Europe. Quelques espèces ont une répartition qui déborde un peu la zone paléarctique notamment en Inde, Pakistan, Éthiopie et Érythrée.

En France, 8 espèces étaient recensées (Lupoli et Dusoulier, 2015) auxquelles il faut ajouter une espèce ibérique découverte dans les Pyrénées Orientales durant mon travail (Sannier, 2019). Six d'entre elles sont relativement rares et ne se rencontrent généralement pas en présence des autres espèces du genre (Lupoli et Dusoulier, 2015). Les trois autres *Eurydema ornata* (L., 1758), *E. oleracea* (L., 1758) et *E. ventralis* Kolenati, 1846 sont très fréquentes et peuvent parfois se trouver au même moment, au même endroit et sur les mêmes Crucifères. Ce sont ces trois espèces qui causent régulièrement des dégâts aux cultures de la famille des Brassicaceae. Le tableau 4 donne la liste des espèces d'*Eurydema* ouest-paléarctiques et précise celles étudiées dans mon mémoire.

Une représentation de chaque espèce étudiée est illustrée sur la planche 1 en figure 14.

Tableau 4 : Liste des espèces et du nombre de spécimens de chaque espèce d'*Eurydema* ouest paléarctiques étudiés et récoltés par année. En grisé, les espèces étudiées et présentes en France. EU : Europe ; AN : Afrique du Nord ; AS ; Asie.

Espèces	Répartition	Avant 2018	2018	2019	2020	Total
<u>Sous-genre <i>Eurydema</i></u>						
<i>eckerleini</i> Josifov, 1961	Grèce, Turquie	0	3	0	0	3
<i>gebleri</i> Kolenati, 1846	Serbie, Russie, AS	5	1	0	0	6
<i>herbacea</i> (Herrich-Schäffer, 1833)	EU, AN	3	0	0	8	11
<i>laticollis</i> Horváth, 1907	Russie, AS	0	0	0	0	0
<i>lundbladi</i> Lindberg, 1960	Canaries, Madère	0	3	0	0	3
<i>nana</i> Fuente, 1972	Espagne	0	0	0	0	0
<i>nigriceps</i> Reuter, 1884	AN	2	0	0	0	2
<i>oleracea</i> (Linnaeus, 1758)	EU, AN	16	28	28	0	72
<i>ornata</i> (Linnaeus, 1758)	EU, AN, AS	62	19	34	0	115
<i>putoni</i> (Jakovlev, 1877)	Russie, AS	0	0	0	0	0
<i>sea</i> Baena, Péricart, & De la Rosa, 2004	Espagne, France	0	1	33	1	35
<u>Sous-genre <i>Horvatheurydema</i></u>						
<i>fieberi</i> Fieber, 1837	EU, AN, AS	0	9	10	5	24
<i>rotundicollis</i> (Dohrn, 1860)	EU	1	3	2	0	6
<i>rugulosa</i> (Dohrn, 1860)	EU, AS	0	2	0	0	2
<u>Sous-genre <i>Rubrodorsalium</i></u>						
<i>cyanea</i> (Fieber, 1864)	Massif pyrénéen	3	4	79	0	86
<i>dominulus</i> (Scopoli, 1763)	EU, NA, AS	5	4	43	1	53
<i>maracandica</i> Oshanin, 1871	Russie, AS	0	0	0	0	0
<i>spectabilis</i> Horváth, 1882	EU, AS	22	0	0	0	22
<i>ventralis</i> Kolenati, 1846	EU, AN, AS	26	9	1	0	36
TOTAL		145	86	230	15	476

2. Spécificités d'hôtes et de niches écologiques des *Eurydema*

Dans le cadre de la taxinomie intégrative, certains aspects du régime alimentaire et des niches écologiques particulières exploitées par plusieurs espèces d'*Eurydema* me seront très utiles pour discuter par la suite de leur statut taxinomique. Je présente ci-après les particularités des espèces qui m'intéressent, du moins celles dont on connaît un minimum la biologie.

2-1 Plantes hôtes

D'une façon générale, les *Eurydema* ont pour plantes-hôtes des Brassicaceae très diverses mais certaines espèces peuvent se développer voire causer des dégâts sur les plantes de familles très différentes. La plupart des espèces sont relativement polyphages mais il existe des exceptions :

E. eckerleini est réputée collectée sur *Capparis spinosa* (Capparidaceae) le câprier commun ; elle est connue uniquement de Crète et du Péloponnèse (Derjanschi et Péricart, 2005).

E. herbacea : Derjanschi et Péricart (2005) la donnent uniquement sur *Cakile maritima* (Brassicaceae) la roquette de mer, ainsi que Lupoli et Dusoulie (2015) qui la considèrent même strictement inféodée à cette espèce.

E. nana vit sur la Brassicaceae d'altitude *Ptilotrichum spinosum*, arbrisseau à fleurs sur substrat calcaire entre 1600 et 1800m dans le Sud de l'Espagne (Derjanschi et Péricart, 2005).

E. sea n'est signalée que sur la Brassicaceae *Hormathophylla spinosa*, arbrisseau à fleur vers 1000 m d'altitude en Espagne (Teruel, Guadalajara et Zaragossa). Sannier (2019) l'a découverte sur la même plante hôte dans les Pyrénées Orientales à 450 m d'altitude sur la commune de Tautavel.

E. oleracea est une des espèces les plus communes en France et plus généralement en Europe. Elle semble peu exigeante et se développe dans une vaste gamme d'habitats et sur plus de 50 genres de Brassicaceae dont les choux, navets, colza, moutardes etc. (Lupoli et Dusoulie, 2015). Des dégâts ont été signalés sur *Lactuca* (Asteraceae), *Asparagus* (Asparagaceae), *Beta* (Amaranthaceae), *Helianthus* (Heliantheae), *Solanum* (Solanaceae) et même sur des céréales de la famille des Poaceae (*Triticum*, *Secale*, *Avena*).

E. ornata est aussi commune qu'*E. oleracea*. La liste des Brassicaceae connues comme plantes hôtes est très longue. Putshkov (1961) en donne une liste pour l'Europe occidentale. Des plantes d'autres familles ont été également signalées comme hôtes de cette espèce : *Cistus* (Cistaceae), *Solanum* (Solanaceae), *Verbascum* (Scrofulariaceae), *Achillea*, *Carduus* (Asteraceae), *Trifolium* (Fabaceae) etc. (Derjanschi et Péricart, 2005, pour plus de détails).

E. ventralis est une troisième espèce très polyphage qui se développe préférentiellement sur de nombreuses espèces de Brassicaceae. Derjanschi et Péricart (2005) en citent une vingtaine ainsi que d'autres plantes appartenant à des familles diverses : *Helianthus* (Heliantheae), *Capparis* (Capparaceae), *Cistrus* (Cisteraceae)...

2-2 Spécialisation de niches écologiques

Les espèces d'intérêt agronomique que je viens de citer (*E. oleracea*, *E. ornata* et *E. ventralis*) sont peu exigeantes non seulement vis-à-vis de leurs plantes hôtes mais aussi des milieux colonisés ce qui explique leur présence en milieux cultivés et les dégâts qu'elles peuvent commettre aux cultures.

Planche 1



Eurydema cyanea



Eurydema dominulus



Eurydema fieberi



Eurydema rotundicollis



Eurydema oleracea



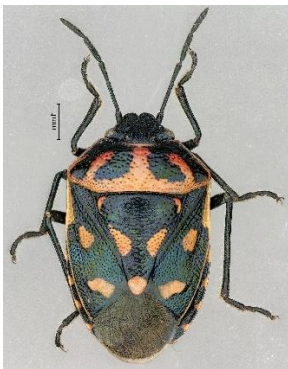
Eurydema oleracea



Eurydema olecracea



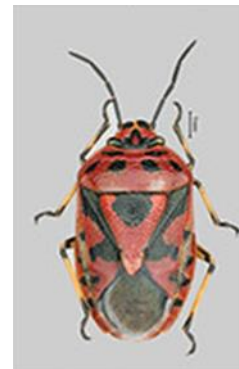
Eurydema sea



Eurydema herbacea



Eurydema ornata



Eurydema ornata



Eurydema ornata



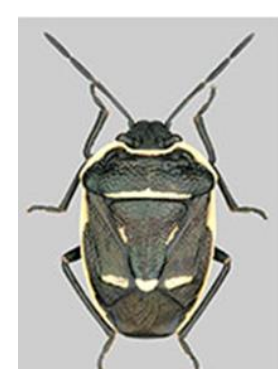
Eurydema spectabilis



Eurydema ventralis



Eurydema ventralis



Eurydema nigriceps

Figure 14 : Illustration des différentes espèces d'Eurydema étudiées.(Photos : J.C. Streito)

E. spectabilis est supposée être limitée aux Brassicaceae côtières psammophiles (vivant sur des substrats sableux) et halophiles (substrats contenant de fortes concentration en sel : Derjanschi et Péricart, 2005).

E. cyanea est une espèce montagnarde connue uniquement du massif pyrénéen en Espagne et en France, (Derjanschi et Péricart, 2005). Lupoli et Dusoulier (2015) précisent qu'elle occupe les milieux rocaillieux acides entre 900 et 2600 m d'altitude.

E. dominulus est une espèce paléarctique dont l'aire de répartition va de la France à l'ouest jusqu'au Japon et la Corée. Cette vaste aire géographique cache toutefois une préférence nette pour les climats continentaux. Ainsi en France, elle est relativement commune dans les départements du Nord et de l'Est de la France, rare ailleurs et totalement absente de toutes les façades maritimes (méditerranéenne, atlantique, Manche et Mer du Nord : Lupoli et Dusoulier, 2015). Elle est collectée principalement dans les milieux humides des secteurs continentaux (Lupoli et Dusoulier, 2015). Dans les Pyrénées nous l'avons collectée dans les mêmes biotopes humides qu'*E. cyanea*, parfois en mélange.

E. fieberi vit surtout dans les biotopes sub-montagneux jusqu'à 2500m en Suisse (Derjanschi et Péricart, 2005). Lupoli et Dusoulier (2015) l'associent pour la France à certains reliefs de l'étage supra-méditerranéen (causses de l'Hérault, du Gard de l'Aveyron et de l'Ardèche, Alpes et Drôme). Elle serait limitée aux altitudes comprises entre 700 et 1250m rarement 1750m dans les Alpes du Sud d'après ces auteurs. Toutefois en raison d'erreurs d'identification avec *E. rotundicollis*, il est très difficile de cerner précisément les exigences écologiques de ces deux espèces.

E. rotundicollis est une espèce alpine qui vit jusqu'à 2500m dans les montagnes d'Europe moyenne et méridionale (Derjanschi et Péricart, 2005) théoriquement un peu plus haut que la précédente.

E. herbacea est une espèce atlantique qui semble strictement inféodée aux zones littorales des côtes atlantiques de l'Europe, de Jersey au sud de l'Espagne, ainsi qu'à Madère.

3. Importance agronomique du genre *Eurydema*.

Les *Eurydema* sont connus de longue date comme des ravageurs appelés couramment «



Figure 15 : Photo illustrant les dégâts d'*Eurydema* sur choux (J.-C Streito)

punaises du chou ». Ces punaises se nourrissent en piquant le limbe des feuilles, graines, fleurs et tiges et en ponctionnant les liquides cellulaires (Sinoglou et Dioli, 2017). Chaque piqûre engendre une tache jaune et en très grand nombre provoque le jaunissement complet des tissus (Figure 15). Les jeunes plantes fortement attaquées peuvent se dessécher et mourir (Bonnemaison, 1961).

Les dégâts d'*Eurydema* sont documentés et signalés de longue date surtout en Russie et en Extrême-Orient. C'est le cas d'*Eurydema dominulus* bien qu'elle semble ne jamais avoir été préjudiciable en Europe occidentale. Derjanschi et Péricart (2005) citent aussi *E. gleberi* Kolenati, 1846 (espèce distribuée de la Russie et jusqu'en Extrême Orient) comme nuisible aux cultures de Brassicaceae. En Europe de l'ouest et notamment en France *E. ventralis* a été signalée dès le milieu du XIXe siècle comme un ravageur redoutable des choux, moutardes, navets et colzas mais Derjanschi et Péricart (2005) considèrent que les dégâts étaient beaucoup moindres au moment où ils ont publié leur synthèse (années 2000). Balachowsky et Mesnil (1936) considèrent que les trois espèces les plus importantes comme ravageurs des cultures sont *E. oleracea* et *E. ornata* ainsi que *E. ventralis* qu'ils nomment « Punaises ornées du chou ».

D'autres genres de Strachiini attaquent les Brassicaceae et sont des ravageurs plus importants dans leur région d'origine. C'est le cas de *Bagrada hilaris* (Burmeister, 1835) dans les régions tropicales de l'ancien monde. Je me suis intéressée à cette espèce d'origine afro-tropicale et asiatique car elle a été introduite et est devenue une espèce invasive très dommageable aux cultures, d'abord aux USA puis au Chili. Cette espèce n'a pas encore été signalée en Europe (à l'exception de l'île Pantellaria, de la Macédoine et de Malte où elle semble établie depuis longtemps). Depuis son invasion et les dégâts considérables qu'elle engendre aux USA, cette espèce est très étudiée et surveillée partout à travers le monde et notamment en France. Il était donc indispensable dans le cadre du projet Impulse que je l'étudie au même titre que les *Eurydema* de manière à fournir des outils rapides et fiables d'identification. Bundy et al. (2018) ont réalisé une synthèse des connaissances actualisée et très fouillée sur cette espèce. On retrouve également dans ces ravageurs très importants le genre *Murgantia* (Velikova, 2010) aux Etats-Unis (Palumbo et Natwick, 2010). J'ai également inclus dans les « punaises du chou » que j'ai étudiées, l'espèce potentiellement invasive *Murgantia histrionica* (Hahn, 1834) qui occupe aux USA les mêmes niches écologiques et présente le même statut agronomique que nos *Eurydema* en Europe.

4. Cycle biologique du genre *Eurydema*

Les espèces ayant une importance agronomique ont des cycles assez similaires (Balachowsky et Ménil, 1936). Elles passent l'hiver à l'état adulte, sous des débris végétaux ou des mottes de terre. Dès le début du printemps (avril-mai en région parisienne, mi-mars plus au sud) elles colonisent les cultures de Brassicaceae. Les accouplements ont lieu sans attendre puis les pontes commencent 20 à 25 jours après (Bonnemaison, 1961). Les œufs sont généralement groupés, pondus le plus souvent sur la plante hôte. Au cours de sa vie une femelle déposera 5 à 6 pontes. La durée d'incubation dépend de l'espèce et surtout de la température (une à deux semaines chez *E. ornata*, un mois chez *E. oleracea*). Les jeunes larves restent groupées sur le lieu de l'éclosion jusqu'à la première mue puis se dispersent et s'alimentent. Le cycle complet de développement comprend 5 stades larvaires. Suivant les espèces et la région géographique, une à deux générations par an sont observées, parfois une troisième plus ou moins

partielle dans les régions les plus méridionales chez *E. ventralis* et *E. ornata* (Derjanschi et Péricart, 2005). Balachowsky et Ménil (1936) considèrent que toutes les espèces n'ont qu'une seule génération par an en France. D'après Bonnemaïson (1961), *E. ornata* présente deux générations dans le midi, alors que *E. oleracea* en aurait qu'une dans toute la France.

5. Critères morphologiques et difficultés d'identification des espèces d'*Eurydema*

Les Strachiini ont la particularité de posséder des motifs de couleurs vives et/ou contrastées. Les molécules toxiques des Crucifères sont utilisées par les Strachiini pour se protéger contre leurs prédateurs qui sont principalement des Oiseaux. Après un premier contact, les prédateurs associent l'amertume ou la toxicité des Strachiini, héritée des Crucifères, à leurs motifs de couleurs voyantes, et mémorisent cette association (Schlee, 1986). Chez les Strachiini, ces motifs associent le rouge (ou le blanc ou l'orange) au noir (ou au vert ou bleu métallique : Lupoli, 1997). Ils ont été abondamment et précisément décrits depuis Linné (1758). Il en a résulté la description d'un nombre important d'espèces, variétés, variations, formes etc. et une grande confusion taxonomique jusqu'en 1961 - date de la révision de Stichel (Derjanschi et Péricart, 2005 ; Rider, 2006).

En fait, au sein d'une même espèce, la coloration foncière du corps varie au cours de la vie imaginale passant par le blanc, le jaune, l'orangé et le rouge (qui ont reçu des noms de formes *picta*, *ornata*, *decorata* chez *E. ornata* par exemple). Les taches varient de forme selon les « races locales », les générations successives au cours de l'année pour les espèces multivoltines, et sans doute aussi la plante hôte (Derjanschi et Péricart, 2005 ; Dupuis, 1951).

À ce jour la communauté de taxonomistes et de naturalistes qui identifient des *Eurydema* en Europe utilise en routine la faune de Derjanschi et Péricart (2005) et s'entend à quelques exceptions près sur les noms qu'ils attribuent aux spécimens. J'ai pu consulter et utiliser deux collections :

-celles du CBGP dont les *Eurydema* ont été identifiées dans les années 1980 et 1990 par des entomologistes de l'INRA ou/et A. Matocq (MNHN) puis toutes revues par F. Dusoulier en 2008 ;

-celles de J.-C. Streito dont les *Eurydema* ont été identifiées par lui-même puis revues par F. Dusoulier pour la préparation de son ouvrage en 2005.

Au-delà de la coloration, les *Eurydema* présentent des variations morphologiques au niveau des genitalia mâles et dans une moindre mesure femelle. Dupuis (1951) y accorde une grande importance et établit des sous-genres sur cette base. Derjanschi et Péricart (2005) considèrent que chez les mâles, les parandrias (deux parties articulées aux extrémités apicales du pygophore, Figure 16a), le pénis en inflation (Figure 16c) et les paramères (Figure 16b) peuvent apporter des caractères spécifiques. Par contre, ils considèrent contrairement à Dupuis (1959) que les sternites génitaux femelles (Figure 16d)

ne sont que légèrement variables d'une espèce à l'autre. Lupoli et Dusoulier (2015) ainsi que la plupart des ouvrages d'identification n'utilisent pas ces caractères.

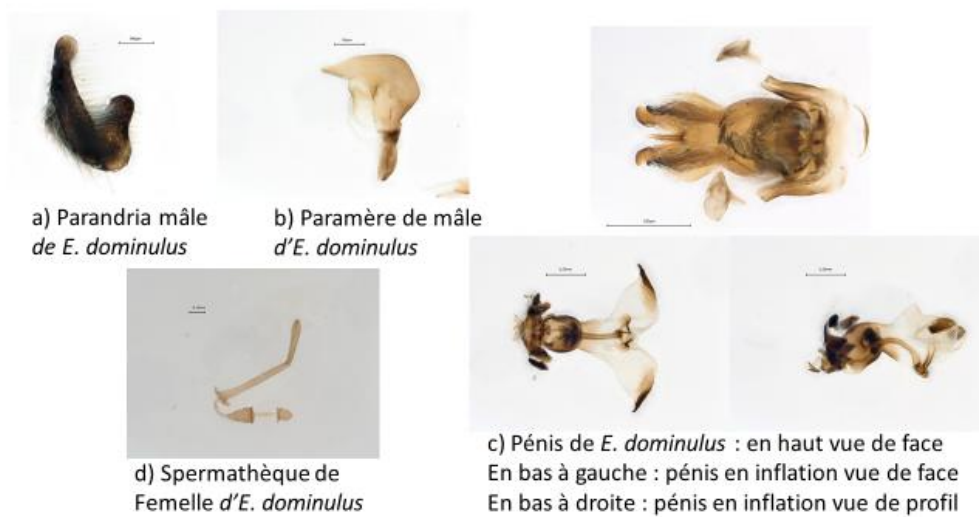


Figure 16: illustration des pièces génitales chez *E. dominulus*

Enfin Dupuis (1959) a utilisé ultérieurement des caractères internes pour

préciser la définition des sous-genres, notamment la présence ou l'absence de spinules (minuscules épines) sur les faces internes du pronotum et du scutellum. Ces détails anatomiques difficiles à voir nécessitent par ailleurs la destruction des spécimens et plusieurs espèces rares demeurent toujours sans placement sous-générique (Rider, 2006 ; Aukema et al., 2013).

Si le genre *Eurydema* ne pose pas de problème majeur aux entomologistes et agronomes, l'identification de ses espèces est basée sur des critères de coloration très peu stables et sujets à d'importantes variations liées notamment à des conditions environnementales (Dupuis, 1951 ; Derjanschi et Péricart, 2005). Ces derniers auteurs considèrent donc que l'identification des espèces à l'échelle européenne demeure malaisée. C'est particulièrement le cas pour quelques groupes d'espèces comme *E. fieberi*/*E. rotundicolis* et *E. ventralis*/*E. spectabilis*/*E. eckerleini*.

Afin de surmonter ces difficultés taxonomiques, certains auteurs ont examiné l'utilité du code-barres ADN et des caractéristiques des organes génitaux masculins (Jung et al., 2011 ; Zhao et al., 2017a, b). Jung et al. (2011) se sont intéressés aux espèces d'*Eurydema* est-asiatiques alors que Zhao et al. (2017a) étudient sept espèces d'*Eurydema* dont trois existantes en France (*E. dominulus*, *E. oleracea* et *E. ventralis*). L'analyse du génome mitochondrial peut par ailleurs offrir une perspective différente en ce qui concerne la phylogénie et la diversification du genre *Eurydema* (Breeschoten et al., 2016). Or aucune phylogénie des espèces françaises n'a été effectuée à ce jour.

Dans ce contexte, il n'est pas superflu de tester la validité des clés morphologiques utilisées actuellement et d'apporter des éléments supplémentaires de diagnose d'espèces toujours difficiles à distinguer notamment *E. fieberi* et *E. rotundicolis*. Selon les principes de la taxinomie intégrative, couplant des outils d'identification moléculaires et morphologiques, nous testerons les critères morphologiques

utilisés pour les espèces européennes et tenterons de proposer des outils fiables d'identification pour tous les stades.

B/ Matériel et méthodes

1- Matériel étudié

Les nombres de spécimens étudiés par espèce se trouvent dans le tableau 5. Mon objectif était d'étudier l'ensemble des 19 espèces ouest-paléarctiques listées dans le tableau 4 et notamment toutes les espèces présentes en France dont *E. ornata*, *E. oleracea* et *E. ventralis* qui présentent un intérêt agronomique. Une partie des spécimens que j'ai étudiés étaient présents dans la collection du CBGP avant que je commence mon étude (145 spécimens du genre *Eurydema* dont 18 séquencés, de 9 espèces). Dix espèces étaient non disponibles et plusieurs (*E. dominulus*, *E. cyanea*, *E. sea* etc.) étaient sous-représentées (peu de spécimens et de localités). Nous avons donc collecté du matériel de trois façons différentes :

- des missions sur le terrain en France en 2018, 2019 et 2020 ciblées sur des espèces particulières,
- des appels réitérés à des collaborateurs pour obtenir des échantillons supplémentaires,
- l'utilisation de spécimens de collections (J.-C. Streito et R. Lupoli) pour des études morphologiques et moléculaires (via des prélèvements de pattes).

Tableau 5 : résumé du nombre de spécimens étudiés en biologie moléculaire par espèce.

Genre	Sous-Genre	Espèce	nb de spécimens
<i>Eurydema</i>	<i>Eurydema</i>	<i>eckerleini</i>	2
		<i>gebleri</i>	3
		<i>herbacea</i>	3
		<i>lundbaldi</i>	3
		<i>nigriceps</i>	2
		<i>oleracea</i>	22
		<i>ornata</i>	34
		<i>sea</i>	4
	<i>Horvatheurydema</i>	<i>fieberi</i>	10
		<i>rotundicollis</i>	5
	<i>Rubrodosalium</i>	<i>cyanea</i>	11
		<i>dominulus</i>	17
		<i>cyanea/dominulus</i>	1
		<i>spectabilis</i>	6
		<i>ventralis</i>	11
<i>Bagrada</i>		<i>hilaris</i>	14
		<i>amoenula</i>	2
<i>Murgantia</i>		<i>histrionica</i>	5
		<i>bifasciata</i>	1
<i>Trochiscocoris</i>		<i>hemipterus</i>	1
<i>Eysarcoris</i>		<i>ventralis</i>	2

C'est dans un contexte de prévention des risques d'introduction, comme expliqué précédemment que *Bagrada amoenula*, Walker, 1870 et *B. hilaris* ainsi que *Murgantia histrionica* Hahn, 1834 et *Murgantia bifasciata* Herrich-Schäffer, 1836 ont été ajoutées à l'analyse.

Au niveau des groupes externes, j'ai pris un spécimen d'une espèce faisant partie de la même tribu des Strachiini qu'*Eurydema* : *Trochiscocoris hemipterus* (Jalovlev, 1880) et une autre d'un genre complètement différent *Eysarcoris ventralis* de la tribu des Eysarcorini qui me servira pour enraciner mes arbres phylogénétiques en plus des espèces de *Bagrada* et *Murgantia*.

Chaque punaise a été identifiée grâce à des clés de détermination morphologiques (Derjanschi et Péricart, 2005 ; Lupoli et Dusoulier, 2015). Les identifications ont toutes été vérifiées par J.-C. Streito. Il n'est pas utile d'effectuer des dissections pour identifier les espèces d'*Eurydema*. Par contre, j'en ai effectué lorsque cela s'est avéré nécessaire, pour vérifier la présence ou l'absence de caractères discriminants lorsque mes analyses moléculaires ont mis en évidence des espèces potentiellement cryptiques (chez *E. ornata* et *E. fieberi*) ou au contraire des espèces plus proches qu'attendu (cas d'*E. cyanea*/*E. dominulus*, *E. spectabilis*/*E. eckerleini* et d'*E. rotundicollis*/*E. fieberi*). Dans ce cas-là j'ai utilisé la technique décrite dans le chapitre 2-2 du Matériels et Méthodes généraux (p. 32).

2- Recherches de marqueurs moléculaires

Comme énoncé dans le chapitre 4-1 « Matériels et Méthodes généraux » (p. 38), une première analyse basée sur le fragment de 658pb du COI a été effectuée sur les échantillons présents au CBGP. Les résultats ont mis en évidence plusieurs problèmes que l'on n'avait pas anticipé :

- les spécimens d'*E. ornata*, se répartissent en deux clades : les spécimens de la péninsule ibérique et du Maroc d'un côté et les autres spécimens (France et Grèce) de l'autre,
- *Eurydema cyanea* et *E. dominulus* ne se différencient pas par code-barres,
- *Eurydema fieberi* et *E. rotundicollis* sont très difficiles à identifier morphologiquement et de manière moléculaire, de même qu'*E. oleracea/herbacea/sea*,
- les spécimens identifiés comme *E. spectabilis* et *E. eckerleini* par deux spécialistes (J.-C Streito et R. Lupoli) ont également des code-barres très proches.

Je me suis surtout intéressée à deux problématiques (le complexe *E. cyanea*/*E. dominulus* et les deux clades d'*E. ornata*). Mon échantillonnage pour les autres espèces était faible et j'ai appliqué la procédure de marqueurs supplémentaires sur les spécimens dont je disposais. Depuis, nos efforts d'échantillonnage ont permis d'accroître le nombre de spécimens disponibles mais avec le confinement dû à la COVID 19, les dernières séquences sur les gènes supplémentaires n'ont pas pu être réalisées pour le moment.

Pour déterminer les gènes supplémentaires à séquencer pour ce genre, je me suis basée sur les publications de Zhao et al. (2019), de Yu et al. (2013) et Zhao et al. (2013). Les domaines transcrits de l'ADN 28S ribosomique comme le domaine D2 a été sélectionné, notamment pour savoir si les deux

groupes d'*E. ornata* ont divergé depuis longtemps ou si leur évolution en deux clades est récente. Les ITS ont un taux de mutations sensiblement plus élevé et ont donc été choisis pour différencier *E. dominulus*, d'*E. cyanea*.

Les séquences ont été obtenues et analysées gène par gène dans un premier temps. Un arbre pour chaque gène a été reconstruit en Neighbour Joining et en Maximum de vraisemblance ainsi qu'une matrice de distance, calculée selon les procédures énoncées dans le chapitre 4 « Matériels et Méthodes généraux ». J'ai ensuite concaténé les séquences mitochondriales (1091 pb) d'un côté et nucléaire (1286 pb) de l'autre puis j'ai obtenu une super-matrice en concaténant l'ensemble des séquences (2377 pb). Les méthodes utilisées ont été décrites dans le paragraphe « Matériels et Méthodes généraux » (p. 38 à 46).

3- Méthodes morphologiques et morphométriques

Pour compléter les analyses moléculaires, une étude sur les genitalia a été menée sur les espèces dont l'identification s'est révélée difficile et non conforme aux résultats de biologie moléculaire. C'est le cas notamment pour *E. cyanea/dominulus*, *E. ornata*, et *E. fieberi/rotundicollis* et *E. spectabilis/eckerleini*. Le protocole utilisé a été décrit dans le paragraphe Matériels et Méthodes généraux (p.32).



Figure 17 : Illustration des emplacements des points homologues étudiés (points rouges) sur les échantillons d'*Eurydema*.

J'ai par ailleurs également étudié en morphométrie avec la méthode des points homologues (landmarks) les espèces *E. cyanea*, *E. dominulus* et les deux clades d'*E. ornata*. Il s'agit d'une étude préliminaire pour savoir s'il pouvait y avoir des différences. Cela a été fait sur quelques photos et non sur l'ensemble de l'échantillonnage. J'ai ainsi inclus dans cette étude 6 spécimens d'*E. ornata* du clade ibérique/Maroc, 12 spécimens d'*E. ornata* d'Europe non ibérique, 11 spécimens d'*E. cyanea* et 11 spécimens d'*E. dominulus*.

La position des points homologues est représentée sur la figure 17.

L'étude de la variation de ces points sur l'ensemble des échantillons sélectionnés est effectuée sous R en utilisant le script mis en annexe 4. Ce script fait appel à plusieurs packages. La méthode est décrite dans le paragraphe « Matériel et Méthodes généraux » (p. 34 à 38)

C/ Résultats

1. Echantillonnage

Comme précisé dans le Matériel et Méthodes (p. 55), il me manquait un grand nombre d'espèces et surtout de spécimens au début du projet. De nouvelles collectes ciblées et la mobilisation de nos réseaux de spécialistes m'a permis de réunir et d'étudier 476 spécimens d'*Eurydema* appartenant

à 15 des 19 espèces paléarctiques. Les trois espèces d'intérêt agronomique ont été collectées avec des effectifs relativement importants (72 spécimens d'*E. oleracea*, 115 d'*E. ornata* et 36 d'*E. ventralis*). Le tableau 4 (p. 48) donne le détail des spécimens échantillonnés ou reçus année par année. Les espèces qui n'ont pu être étudiées sont toutes d'origine extrême-orientale à l'exception d'*E. nana*, une espèce endémique espagnole rare. J'ai pu étudier l'ensemble des espèces connues de France dont *E. sea* découverte en 2019. Par contre, les échantillons remis ou trouvés en fin d'année 2019 et 2020 n'ont pas pu être traités en raison de la crise sanitaire et du confinement, ainsi que de la clôture du projet. J'ai par ailleurs pu ajouter à mes analyses plusieurs espèces de *Bagrada* de manière à valider mes séquences COI de l'espèce invasive *B. hilaris*. Pour cette dernière, plusieurs localités des zones d'origine (Afrique) et envahie (Amériques du Nord et Sud) ont pu être étudiées. J'ai obtenu également deux espèces de *Murgantia*, un genre américain peu commun dans les collections en Europe mais potentiellement envahissant également.

2- Résultats moléculaires

2.1. Barcoding

Un premier arbre a été reconstruit avec l'ensemble des séquences COI que j'ai réalisé en utilisant la méthode du Neighbour Joining avec le modèle d'évolution de Kimura deux paramètres (K2P) et 1000 répliques de bootstrap. Celui-ci est représenté en annexe 6. Ces mêmes séquences ont ensuite servi à réaliser un second arbre en Maximum de vraisemblance qui est présenté en figure 18.

2-1-1 Espèces d'importance agronomique

Le fragment COI permet de correctement différencier ces espèces (*E. ornata*, *E. oleracea* et *E. ventralis* ; Figure 18). En ce qui concerne, *E. ventralis*, les échantillons se regroupent très bien entre eux (BP = 89) et sont groupe frère du clade formé par les espèces *E. eckerleini* et *E. spectabilis* (BP = 100). Il est à noter que les distances génétiques entre *E. ventralis* et *E. eckerleini*, et entre *E. ventralis* et *E. spectabilis* sont respectivement de 3,7% et 3,6% alors que pour les autres espèces du genre, les distances sont d'environ 8 à 9% (Tableau 6). Pour *E. oleracea*, les échantillons forment un seul et même clade très bien soutenu avec les deux méthodes de reconstruction. Quant aux échantillons de *E. ornata*, ils se séparent en deux clades géographiques bien distincts : la France/Grèce d'un côté et le Maroc/Espagne de l'autre. Les deux clades sont soutenus fortement (BP ML= 96 pour les échantillons provenant de France/Grèce et BP ML= 76 pour ceux du Maroc et d'Espagne).

La caractérisation de ces trois espèces d'intérêt agronomique par rapport aux espèces dites « sauvages » qui leurs sont proches n'est cependant pas si évidente pour deux de ces trois espèces. Pour *E. ventralis*, il n'existe pas de problème de différenciation avec le COI, du moins avec les échantillons que j'ai pu étudier. Le code-barres place *E. oleracea* dans un groupe bien supporté (BP NJ = 100) incluant les

espèces *E. sea* et *E. herbacea*. Les distances génétiques entre ces trois espèces sont de l'ordre de 0.8% entre *E. oleracea*/*E. sea*, de 1,1% entre *E. oleracea*/*E. herbacea* et de 1,3% entre *E. herbacea*/*E. sea*.

Enfin, on a une espèce morphologique qui donne deux populations géographiques très distinctes, *E. ornata* France, Grèce, Crète et *E. ornata* Espagne, Maroc, avec une distance de 4,6% entre les deux groupes (Tableau 6). On se rapproche clairement ici d'un niveau spécifique (même distance qu'*E. ornata*/*E. oleracea* qui est de 3,9% à 5,5% en fonction du clade choisi). Il est à noter également que la distance génétique entre les deux clades d'*E. ornata* est proche de celle entre *E. ornata* et *E. lundbaldi* (distance de 4,7%).

2-1-2 Espèces sans intérêt agronomique

D'après l'arbre reconstruit, on distingue trois cas avec des problématiques différentes.

- 1^{er} cas : *E. fieberi* et *E. rotundicollis*.

Il existe trois clades bien différenciés qui rendent *E. fieberi* paraphylétique et qui sont expliqués par la géographie : les individus de Grèce se regroupent à la base d'un embranchement (BP = 78) qui comprend tous les autres *Eurydema*. Les deux autres clades regroupent d'un côté les individus d'Espagne (BP = 97) et de l'autre les individus de France qui se trouvent groupe frère de *E. rotundicollis* (BP = 94). Dans la matrice des distances j'ai regroupé tous les clades d'*E. fieberi* ce qui explique la distance intra-spécifique de 4,5 %, mais aussi une distance interspécifique de 4,3 % avec *E. rotundicollis* qui en fait est beaucoup plus faible si on ne considère que les spécimens d'*E. fieberi* d'origine française (1,9%). Il est à noter que ces deux espèces *E. fieberi* et *E. rotundicollis* sont difficiles à identifier également morphologiquement.

- 2nd cas : *E. spectabilis* et *E. eckerleini*

L'identification morphologique de ces deux espèces est impossible actuellement. J'ai volontairement laissé ici les identifications réalisées par J.-C. Streito (*E. spectabilis*) et R. Lupoli (*E. eckerleini*) pour désigner des spécimens de Crète collectés sur câprier. La distance génétique entre ces deux groupes d'échantillons collectés à l'ouest et à l'est de l'île est de 0,5 % ce qui est peu. Il est probable en fait que tous les spécimens étudiés appartiennent à une seule espèce. Ceci dit, les deux groupes sont bien supportés et il faudrait d'autres gènes pour avoir plus de précisions (Pour plus de détails voir la discussion ci-après).

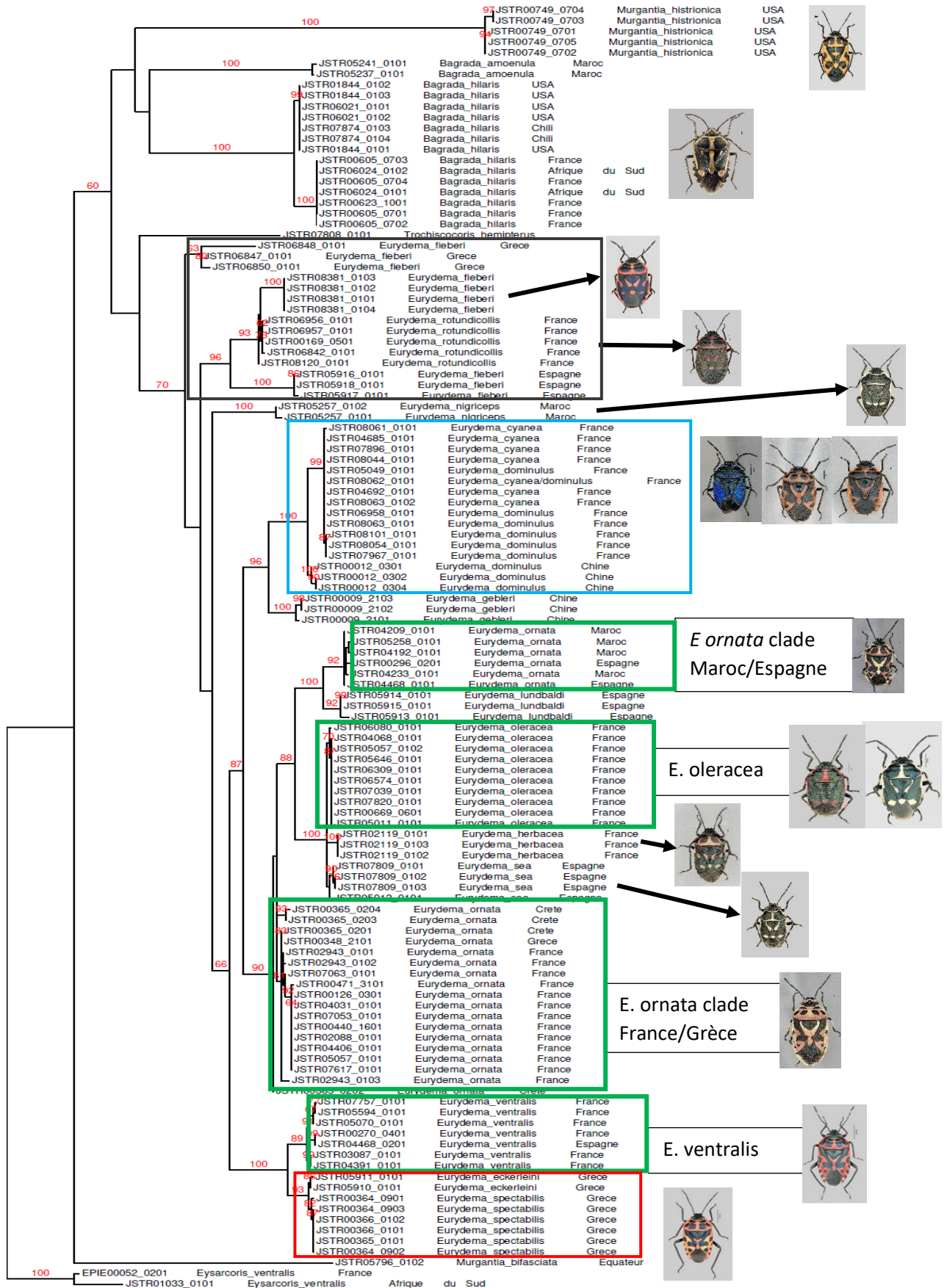


Figure 18 : arbre phylogénétique reconstruit à partir des séquences COI en ML avec 1000 répliquions de bootstrap. Les espèces d'intérêt agronomique sont encadrées en vert. Les espèces sans intérêt agronomique, en noir *E. fieberi*/*E. rotundicollis*, en rouge *E. eckerleini*/*E. spectabilis*, en bleu *E. dominulus*/*E. cyanea*.

Tableau 6 : Matrice des distances interspécifiques calculées à partir des séquences COI avec le modèle d'évolution K2P.

1	E_eckerlini																										
2	E_gebleri	0,094																									
3	E_hebecea	0,085	0,073																								
4	E_lundbaldi	0,086	0,078	0,058																							
5	E_nigiceps	0,095	0,070	0,086	0,079																						
6	E_oblancea	0,082	0,069	0,011	0,056	0,083																					
7	E_omata_France_Grece	0,069	0,057	0,043	0,047	0,065	0,041																				
8	E_omata_Maroc_Espagne	0,088	0,070	0,055	0,025	0,088	0,055	0,047																			
9	E_sea	0,089	0,073	0,013	0,060	0,083	0,008	0,043	0,060																		
10	E_fieberi_France	0,076	0,084	0,100	0,094	0,083	0,095	0,075	0,092	0,099																	
11	E_fieberi_Espagne	0,095	0,100	0,095	0,100	0,088	0,093	0,081	0,096	0,095	0,058																
12	E_fieberi_Grece	0,090	0,077	0,079	0,083	0,061	0,079	0,058	0,081	0,084	0,056	0,069															
13	E_rotundicollis	0,083	0,086	0,095	0,090	0,081	0,092	0,073	0,089	0,094	0,019	0,061	0,056														
14	E_cyanea	0,085	0,054	0,079	0,082	0,091	0,078	0,061	0,075	0,082	0,096	0,097	0,097														
15	E_dominulus_Chine	0,094	0,048	0,078	0,077	0,086	0,073	0,062	0,072	0,077	0,095	0,100	0,085	0,096													
16	E_dominulus_France	0,086	0,055	0,090	0,082	0,092	0,078	0,061	0,076	0,082	0,097	0,097	0,097	0,097	0,018												
17	E_rubrodorsatum_cyanea_dominulus	0,085	0,055	0,079	0,081	0,091	0,077	0,061	0,076	0,081	0,096	0,097	0,073	0,097	0,001	0,018											
18	E_spectabilis	0,005	0,086	0,082	0,086	0,098	0,079	0,070	0,087	0,085	0,076	0,093	0,080	0,082	0,086	0,096	0,087	0,087									
19	E_ventralis	0,036	0,085	0,082	0,092	0,101	0,079	0,074	0,086	0,085	0,092	0,085	0,083	0,082	0,086	0,093	0,085	0,086	0,037								
20	Bagrada_hilaris_Ja_Reunion	0,149	0,155	0,165	0,168	0,148	0,167	0,152	0,158	0,167	0,155	0,161	0,132	0,159	0,157	0,162	0,158	0,157	0,150	0,155							
21	Bagrada_hilaris_USA	0,141	0,151	0,161	0,163	0,146	0,164	0,144	0,155	0,163	0,150	0,153	0,130	0,152	0,157	0,162	0,158	0,157	0,139	0,148	0,020						
22	Bagrada_amoena	0,128	0,141	0,153	0,143	0,135	0,148	0,140	0,155	0,151	0,143	0,146	0,137	0,144	0,147	0,145	0,144	0,129	0,130	0,146	0,144						
23	Trochiscocoris_hemitherus	0,134	0,147	0,148	0,147	0,135	0,146	0,130	0,140	0,152	0,140	0,135	0,104	0,134	0,134	0,140	0,136	0,135	0,132	0,142	0,159	0,151	0,163				
24	Murgantia_historica	0,174	0,178	0,189	0,193	0,173	0,188	0,178	0,179	0,191	0,172	0,167	0,144	0,176	0,170	0,179	0,170	0,170	0,174	0,176	0,190	0,188	0,199	0,183			
25	Murgantia_bifasciata	0,156	0,170	0,178	0,177	0,171	0,172	0,156	0,173	0,177	0,161	0,172	0,150	0,162	0,176	0,179	0,177	0,176	0,159	0,165	0,200	0,188	0,174	0,176	0,193		
26	Outgroup_Eysarcoris_ventralis	0,133	0,146	0,146	0,129	0,145	0,146	0,131	0,138	0,145	0,126	0,128	0,132	0,127	0,140	0,147	0,141	0,140	0,132	0,149	0,163	0,153	0,145	0,139	0,200	0,158	

- 3^{ème} cas : *E. cyanea* et *E. dominulus*

Les individus d'*E. dominulus* se séparent en deux clades géographiques : l'un formé par ceux provenant de Chine (BP = 100) et l'autre par ceux provenant de France, ce dernier incluant les spécimens identifiés comme appartenant à *E. cyanea* (BP = 99). La distance génétique entre les clades chinois et français d'*E. dominulus* est de 1,8%. Dans la matrice des distances intra-spécifiques (annexe 11), le 0,97 % d'*E. dominulus* est expliqué par le fait que les spécimens chinois ne sont pas différenciés dans la matrice. Il n'existe pas de séparation nette entre *E. dominulus* de France et *E. cyanea* et la distance est très faible (0,1%). De plus, un échantillon de détermination incertaine (JSTR08062_0101 noté *E. rubrodorsalum dominulus/cyanea* et à couleur intermédiaire entre les deux taxons) se retrouve dans ce clade formé par les deux espèces récoltées en France en mélange mais avec une distance de 0% avec *E. cyanea* et 0,6% avec *E. dominulus*.

2-1-3 Histoire des sous-genres

La validité des sous-genres d'*Eurydema*, à savoir *Eurydema*, *Rubrodorsalum* et *Horvatheurydema* est régulièrement remise en cause. La question qui se pose alors est de savoir si la phylogénie COI permet de retrouver les trois sous-genres ?

L'arbre phylogénique du COI montre plusieurs groupes d'espèces bien soutenus : *E. ventralis/E. spectabilis/eckerleini* (bootstrap 100%) ; *E. ornata/lundbaldi/oleracea/sea/herbacea* (92%) ; *E. dominulus/E. cyanea + E. gleberi* (97%) ; *E. fieberi/E. rotundicollis* (97%) et seules *E. nigriceps* et *E. fieberi* (populations de Grèce) en sont exclues. Le placement des espèces dans leurs sous-genres respectifs est grossièrement respecté : *E. oleracea/E. herbacea/E. sea/E. ornata/E. lundbaldi* dans le sous-genre *Eurydema*, *E. dominulus/E. cyanea + E. ventralis/E. spectabilis* dans le sous-genre *Rubrodorsalum*, *E. fieberi/E. rotundicollis* (sauf *E. fieberi* de Grèce) dans le sous-genre *Horvatheurydema*. Toutefois, *E. gleberi* devrait être dans le clade regroupant les espèces du sous-genre *Eurydema* alors qu'elle se branche à la base des espèces du sous-genre *Rubrodorsalum* dont elle se sépare toutefois très clairement. Dans le sous-genre des *Eurydema*, l'espèce *E. nigriceps* ne se retrouve pas avec les autres espèces qui le composent. Elle est isolée dans l'arbre mais cette séparation n'est pas très soutenue (BP = 61). Les distances génétiques interspécifiques indiquent 8,2% de différences entre *E. nigriceps* et le clade « France » *E. ornata*, et 6,5% avec le clade « Maroc/Espagne » soit la distance la plus faible entre *E. nigriceps* et toutes les autres espèces d'*Eurydema*. Pour ce qui est d'*E. eckerleini*, elle est très proche d'*E. spectabilis* (0,5%) et *E. ventralis* (3,6%) mais nous pensons que nos spécimens sont mal identifiés (voir discussion). *Eurydema fieberi* est un taxon qui renferme sans doute plusieurs entités, dont les spécimens grecs qui sont même à l'extérieur du clade représentant le sous-genre *Horvatheurydema*.

2-1-4 Les espèces potentiellement invasives

Le fragment COI permet de différencier sans aucune ambiguïté les individus du genre *Bagrada* de ceux des espèces d'*Eurydema*. Les distances génétiques entre ces deux genres sont supérieures aux distances entre les espèces du genre *Eurydema* (12,9%-16,3% *versus* < 9,7%). *Bagrada hilaris* forme deux clades géographiques (les populations d'Afrique et celles invasives en Amérique -USA/Chili), fortement soutenus (BP = 100) et avec une distance génétique de 1,1% élevée par rapport à ce qui est observé chez les *Eurydema* (0 à 0,9% si on fait abstraction d'*E. fieberi*). *Bagrada amoenula* est de façon mal soutenue groupe frère de *B. hilaris* mais la distance génétique entre ces deux espèces est très élevée (>14%) alors que l'on observe des distances parfois inférieures entre *B. amoenula* et certaines espèces d'*Eurydema*.

Murgantia histrionica se sépare également sans ambiguïté de toutes les espèces des genres *Eurydema* et *Bagrada* avec des distances génétiques supérieures à 17% et inclut de façon inattendue deux clades car tous les spécimens séquencés proviennent d'un seul et unique prélèvement. *Murgantia bifaciata* se retrouve à la base de l'arbre loin des autres espèces et notamment de *M. histrionica* avec laquelle la distance génétique est de 19,3 % soit une des distances les plus importantes observées au sein des espèces de Strachiini que j'ai étudiées.

Trochiscocoris hemipterus se place correctement car il fait partie de la même famille que les *Eurydema* contrairement à *Eysarcoris ventralis* qui est l'outgroup véritable.

Chez les *Eurydema*, la majorité des groupes moléculaires correspondent bien aux espèces morphologiques habituellement admises. Certaines sont des espèces bien tranchées qui ne posent pas véritablement de problème, ni en terme de morphologie, ni en terme moléculaire. Les distances interspécifiques sont comprises entre 5,8 et 10,77% (Tableau 6). D'autres espèces sont moins nettement distantes, mais sans que cela ne gêne leur assignation. Toutefois, il existe quatre cas d'espèces morphologiques que le COI soit ne confirme pas ou qu'il sépare en plusieurs clades.

3- Cas des deux clades de *E. ornata*

3-1 Analyses moléculaires

L'utilisation d'un autre gène mitochondrial, le Cytb, permet de confirmer ces deux clades. Les arbres reconstruits en NJ se trouvent en annexe 6. Il existe bien une séparation des échantillons d'*E. ornata* par zones géographiques comme avec le COI : France/Grèce *versus* Espagne/Maroc.

Par contre, la distinction des deux clades d'*E. ornata* n'est pas visible avec le gène 28S qui a été amplifié sur un plus grand nombre d'individus de plusieurs espèces du genre. Ce gène ne permet pas de séparer les deux clades géographiques d'*E. ornata* mais pas non plus les autres espèces du sous-genre *Eurydema* particulièrement *E. lundbaldi* mais aussi des espèces *oleracea/herbacea/sea + gleberi*. À noter que c'est également vrai pour les autres groupes d'espèces : *E. ventralis/spectabilis* ; *E. dominulus/cyanea* ; *E.*

feberii/rotundicollis. On peut donc en conclure que le gène 28S n'apporte pas d'information dans la phylogénie des espèces étudiées.

Enfin, avec l'arbre reconstruit à partir des séquences des ITS, les deux clades d'*E. ornata* sont peu soutenus : les deux groupes géographiques se séparent mais les BP sont faibles et il existe un échantillon d'*E. ornata* provenant de localités françaises dans le clade ibérico-marocain. C'est d'autant plus surprenant que cet individu appartient à un échantillon (même lieu de collecte et même jour) dont certains spécimens sont correctement groupés avec les spécimens originaires de France et de Grèce.

La concaténation moléculaire sur l'ensemble des quatre gènes (2377 pb) permet de donner l'arbre illustré en figure 19. Les deux clades y apparaissent bien visibles et soutenus.

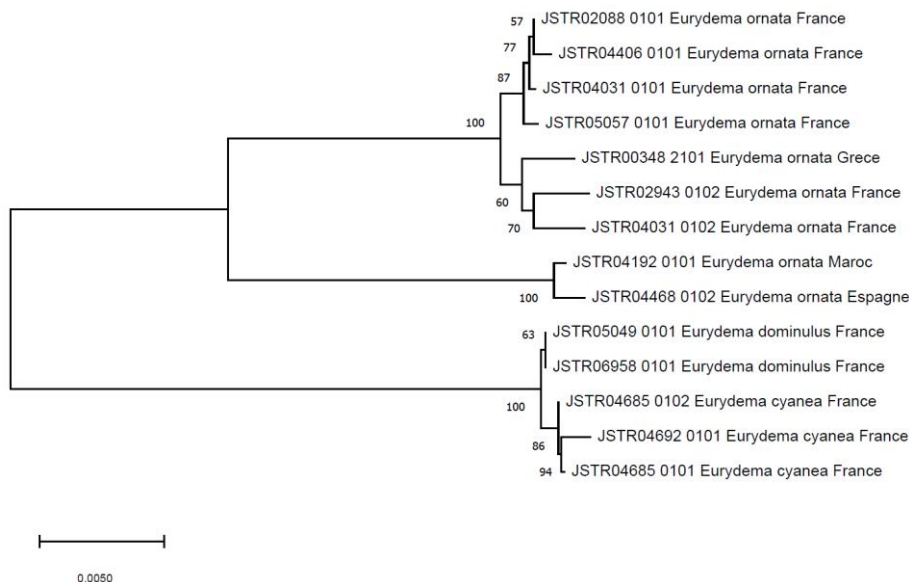


Figure 19 : arbre phylogénétique reconstruit en NJ avec 1000 répliquions de bootstrap sur les séquences concaténées(2377pb) des espèces ciblées *E. ornata*, *E. dominulus* et *E. cyanea*.

3-2 Analyses morphométriques par points homologues

Le travail d'identification a été fait dans un premier temps à l'aide des caractères disponibles dans les clés existantes. Il s'agissait donc essentiellement de critères de couleur (voir figure 19). Les critères de coloration étant assez superficiels pour séparer des espèces, on a donc cherché des caractères plus stables et dont le poids évolutif est plus important comme par exemple la forme générale et les genitalia.

Après avoir appliqué le script sous R sur les points homologues déterminés sur 31 individus représentant les espèces d'*Eurydema dominulus*, *E. cyanea* et *E. ornata*, j'ai obtenu le graphe illustré sur la figure 20. L'axe horizontal exprime de gauche à droite la variation de la largeur du pronotum couplée avec celle de la tête. En analysant les 20 échantillons d'*E. ornata* séquencés, aucun groupe ne se distingue nettement et en particulier pas les deux clades moléculaires à base géographique.

Bien que les paramères des différentes espèces de ce groupe (*ornata/oleracea/herbacea/sea*) soient très homogènes (Derjanschi et Péricart, 2005), j'ai malgré tout disséqué quelques spécimens d'*E. ornata* de

France et d'Espagne pour essayer de trouver d'éventuelles différences au niveau des pygophores, parandrias et paramères, mais sans succès.

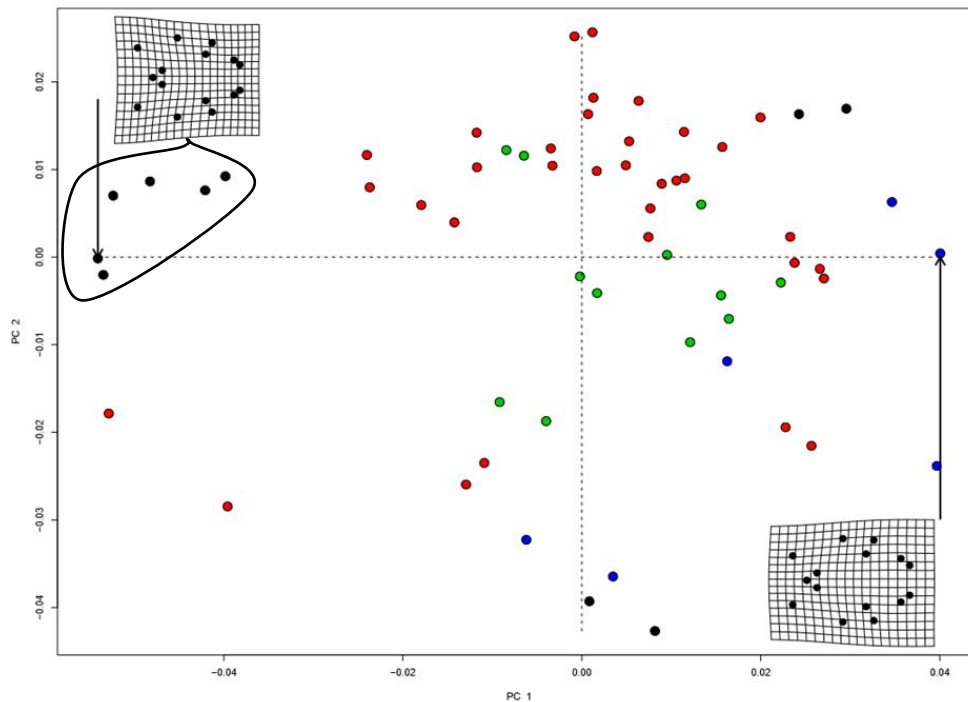


Figure 20 : Représentation graphique donnée par le script R après utilisation des packages stereomorph, geomorph et shiny. En rouge, *E. ornata* de France, en vert ; *E. ornata* du Maroc et d'Espagne ; en noir, *E. dominulus* ; en bleu *E. cyanea*. Les échantillons d'*E. dominulus* provenant de Chine sont entourés de noir.

4- Cas du complexe *Eurydema dominulus/cyanea*

4-1 Analyses moléculaires

Comme vu précédemment, le fragment COI servant au code-barres n'est pas suffisant pour différencier *E. dominulus* de *E. cyanea*. La distance génétique interspécifique entre ces deux espèces est 0,7%, elle devient nulle en enlevant les échantillons d'*E. dominulus* de Chine. Il faut donc trouver d'autres gènes notamment nucléaires qui puissent éventuellement les différencier. Les mêmes gènes que pour les deux clades d'*E. ornata* ont été amplifiés et séquencés (Cytb, 28S et ITS). Les échantillons de *E. cyanea* disponibles au moment des analyses étaient en sous-effectif mais ils permettent néanmoins de se faire une idée en vue des analyses à réaliser sur l'ensemble de l'échantillonnage.

Le Cytb permet de différencier les deux espèces composant ce complexe (annexe 6), avec des BP peu élevés cependant, et des distances faibles au regard notamment des spécimens d'*E. dominulus* de Chine. En augmentant l'effectif et la diversité géographique des provenances et en séquençant ce gène sur l'ensemble de l'échantillonnage des *Eurydema*, le résultat pourrait être différent. Le gène 28S ne sépare pas les espèces du complexe. Les séquences ITS permettent de regrouper les échantillons de *E. dominulus* de Chine avec ceux de France et cela avec un fort support (BP = 100), et de séparer avec un nœud un peu moins soutenu (BP = 63) les deux espèces.

La concaténation de l'ensemble des gènes sur l'ensemble de l'effectif des *Eurydema* est représenté en annexe 6 car l'arbre n'apporte rien de plus concernant l'identification et la reconnaissance des espèces.

4-2 Analyses morphométriques par points homologues

Sur la figure 20, des points noirs matérialisant l'espèce *E. dominulus* se détachent des autres, correspondant aux spécimens d'*E. dominulus* chinois. Malheureusement, seulement les échantillons disponibles en 2018 ont pu être photographiés et analysés avec cette méthode. Il est possible qu'en rajoutant des spécimens, on améliore la discrimination entre ces groupes.

4-3 Analyses morphologiques

J'ai disséqué 4 mâles et une femelle d'*E. dominulus* et 2 mâles et 2 femelles d'*E. cyanea* afin de voir si des différences exploitables étaient disponibles au niveau des pièces génitales. La figure 21 illustre ces différentes dissections. Je n'ai pas observé de différence exploitable au niveau des



Figure 21 illustration de différents paramères gauches et droits d'*E. dominulus* et *E. cyanea* ainsi que trois spermathèques d'*E. cyanea* et *E. dominulus*

spermathèques, ni des pénis dont un seul était en inflation. Comme l'indiquent Derjanschi et Péricart (2005), l'étude des pénis est difficile en pratique suite aux différents états qu'ils peuvent présenter entre repos et inflation. L'orientation des parandrias fait varier grandement leur aspect. Je n'ai pas non plus trouvé de différences à ce niveau. Les paramères d'*E. cyanea* que j'ai disséqués présentent une hampe moins épaisse, une lame plus étroite et effilée que chez ceux d'*E. dominulus*. Toutefois je n'ai pu disséquer qu'un nombre restreint de spécimens et surtout provenant tous de localités très voisines ce qui ne permet pas d'apprécier l'étendue de variabilité intraspécifique. Déjà sur ce petit nombre d'échantillons, certains individus présentent des paramères dont la lame est intermédiaire entre les deux extrêmes (par exemple JSTR06839) et il est probable que cette différence ne résiste pas à une augmentation de l'effectif.

4-4 Observation d'accouplements mixtes *E. cyanea* x *E. dominulus* dans la nature

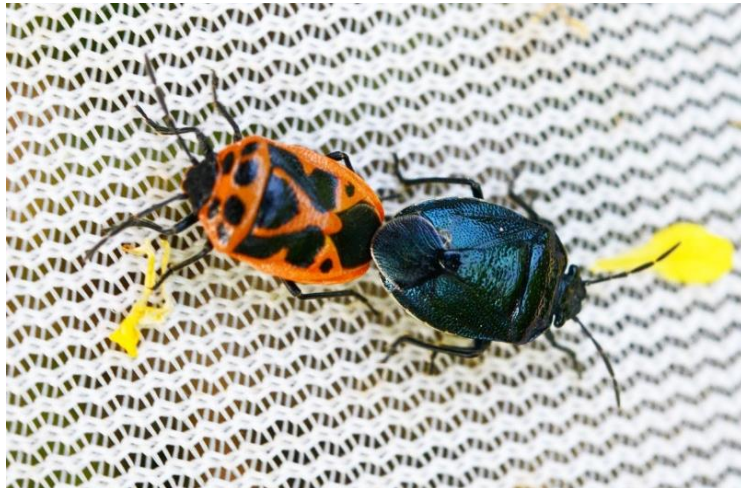


Figure 22: Accouplement naturel entre un individu *E. dominulus* et un individu *E. cyanea* Photographie effectuée par Jean-Claude Streito lors d'une mission.



Figure 23 : Photographie de l'échantillon intermédiaire *cyanea/dominulus* JSTR 8062_0101

Lors de prospections ciblées dans le Parc national des Pyrénées (Lescun, parking Ansabère 1178 m d'altitude 05 VII 2019) pour augmenter l'échantillonnage d'*E. cyanea* et *E. dominulus*, un accouplement mixte a été observé dans la nature sur un pied de *Sisymbrium austriacum* (Figure 22). J'ai par ailleurs mis en élevage des spécimens d'*E. cyanea* mâles (05VII2019 Ansabère) avec des *E. dominulus* femelles (14VII2019 Eaux Bonnes). J'ai obtenu sans difficulté des

accouplements mixtes, des pontes et des larves. L'élevage en été à Montpellier a été difficile notamment en terme d'alimentation, mais les quelques adultes (Figure 23) en F1 avaient un habitus d'*E. dominulus* (rouge et noir). À noter que la mère n'était pas forcément vierge et donc qu'il n'est pas exclu que le père des larves obtenues ne soit pas le mâle d'*E. cyanea* avec lequel elle s'est accouplée. Les adultes de la génération F1 n'ont pas survécu à la chaleur estivale de Montpellier et l'élevage a dû être arrêté.

D/ Interprétation et discussion

Il s'avère finalement que le COI permet de discriminer presque toutes les espèces que nous avons analysées. Les espèces potentiellement invasives *B. hilaris* et *M. histrionica* sont logiquement séparées entre elles et de toutes les espèces d'*Eurydema*. La validation des séquences va permettre de compléter la base de données Arthémis du CBGP et Qbank de l'OEPP et de fournir, en cas de nouvelles découvertes des séquences permettant d'identifier n'importe quel stade de ces espèces et avec une bonne fiabilité. Dans cette optique l'existence de deux clades bien différenciés chez *B. hilaris* ne remet pas en cause l'outil d'identification moléculaire. Par contre cet exemple montre qu'il est nécessaire d'analyser le maximum de populations d'une espèce pour permettre son identification fiable. Dans l'absolu tous les haplotypes devraient être renseignés et disponibles.

Les trois espèces d'*Eurydema* d'importance agronomique en France *E. ornata*, *E. oleracea* et *E. ventralis* sont également différenciées avec une bonne fiabilité avec le COI. J'ai séquencé davantage de spécimens que ceux qui sont figurés sur l'arbre 23 tronqué pour des raisons de lisibilité. Au total j'ai

obtenu 39 séquences COI d'*E. ornata*, 22 d'*E. oleracea* et 13 d'*E. ventralis*, et toutes assignées à la même espèce que l'identification morphologique. J'ai séquencé beaucoup moins de spécimens concernant le gène nucléaire 28S. En effet, celui-ci se révèle moins résolutif au niveau spécifique et quelques spécimens bien assignés avec le COI se retrouvent même dans le mauvais clade, avec peu de soutien. C'est le cas notamment chez *E. oleracea*. Comme précédemment, le fait d'observer deux groupes de séquences COI distants de 4,5% au sein d'*E. ornata* ne remet pas en cause l'identification à partir du moment où ces deux séquences sont disponibles dans la base. Se posent par contre des questions taxonomiques sur lesquelles je vais revenir. D'un point de vue « agronomie et risque phytosanitaire », mon travail permet donc de disposer d'une base de séquences validées qui permet à présent une identification de tous les stades des *Eurydema* d'intérêt agronomique en Europe Occidentale et la surveillance de deux espèces de Strachiini potentiellement invasives. Ceci n'est valable que dans un contexte agronomique où la diversité des *Eurydema* est réduite à 3 espèces. Le fait de circonscrire ainsi l'emploi du code-barres à un contexte particulier permet d'en améliorer la fiabilité même en présence de problèmes taxonomiques non résolus par ce marqueur concernant des espèces de « milieux naturels ». L'intérêt de limiter géographiquement l'échantillonnage et la diversité des séquences pour améliorer les performances du code-barres a déjà été évoqué par Bergsten et al. (2012) et s'applique bien à mon cas d'étude.

Il reste pourtant plusieurs problèmes non résolus avec le COI pour le genre *Eurydema* :

- des espèces mal différenciées (*E. dominulus* / *E. cyanea* ; *E. oleracea* / *E. herbacea* / *E. sea*),
- des espèces pour lesquelles la diversité génétique est très élevée ce qui pose la question de l'existence éventuelle d'espèces cryptiques (*E. ornata* et *E. fieberi*),
- des limites dans l'identification des espèces *E. spectabilis*/*E. eckerleini*,
- des espèces positionnées dans un mauvais sous-genre (*E. gleberi* et *E. nigriceps*).

Statut taxonomique de l'espèce *E. cyanea*

Eurydema cyanea n'est pas différenciée des populations d'*E. dominulus* de France avec le gène COI. Il existe par contre une variabilité intra-spécifique élevée au sein d'*E. dominulus* notamment entre les populations de France et celles de Chine. Une grande variabilité intra-spécifique au sein d'une espèce aussi largement répandue est peu surprenante surtout lorsqu'on compare les populations les plus éloignées. Zhao et al. (2017b) différencient d'ailleurs plusieurs « types » au sein des échantillons d'*E. dominulus* de Chine qu'ils ont étudiés. Mon travail montre en outre que le Cytb et surtout le gène 28S ne sont pas non plus utiles pour différencier *E. cyanea* d'*E. dominulus* en France : en revanche, on obtient une différenciation plus marquée avec le gène ITS qui réunit dans un clade unique les échantillons d'*E. dominulus* de France et de Chine. Lors de ces analyses, je ne disposais que d'un nombre limité de spécimens de ces deux espèces (uniquement des Pyrénées Atlantiques pour *E. cyanea* ; des Pyrénées Atlantique à la Corrèze pour *E. dominulus*). Un échantillonnage plus représentatif de l'aire de

répartition de ces deux espèces pourrait compléter, voire remettre en cause mes résultats. Quoiqu'il en soit *E. cyanea* et *E. dominulus* sont deux espèces très proches génétiquement. Je n'ai pas non plus trouvé de différences au niveau des genitalia, ni dans les études morphométriques que j'ai menées mais là encore sur le petit nombre d'échantillons dont je disposais.

Eurydema cyanea est relativement commune dans les Pyrénées dont elle est endémique et *E. dominulus* plutôt rare dans l'hexagone avec seulement une cinquantaine de stations connues (Lupoli et Dusoulier, 2015). *Eurydema cyanea* est considérée comme une espèce d'altitude pouvant descendre jusqu'à 900 m (Lupoli et Dusoulier, 2015), or nos spécimens étudiés ont été collectés entre 1180 et 2383m. *Eurydema dominulus* est connue en zone continentale de plaine et est considérée comme rare dans les montagnes du sud de la France. Derjanschi et Péricart (2005) la mentionnent jusqu'à 1100 m en France. Nous avons donc deux taxons, *E. dominulus* plutôt en plaine et *E. cyanea* d'affinité nettement montagnarde mais dont les exigences altitudinales se chevauchent vers 1000 m. C'est ce que nous avons constaté sur le terrain avec l'accouplement mixte observé à Ansabère dans les Pyrénées Atlantique à 1178 m d'altitude. Cette répartition altitudinale est importante pour essayer d'expliquer la différenciation de ces deux taxons, la couleur des *Eurydema* (tout comme celle des *Lygus* que j'aborderai ensuite dans le chapitre III) étant parfois associée aux conditions climatiques comme vu plus haut.

Les deux taxons peuvent s'accoupler, non seulement en élevage mais aussi en conditions naturelles comme constaté ici. Les œufs pondus par des femelles d'*E. dominulus* accouplées à des mâles d'*E. cyanea* ont éclos et donné des larves viables et j'ai obtenu en élevage des individus ayant un habitus typique d'*E. dominulus*. Je n'ai malheureusement pas pu faire le croisement inverse faute de matériel (pas de femelles vivantes d'*E. cyanea*). Toutefois ces accouplements confirment que ces espèces sont proches et que les différences éventuelles au niveau des genitalia, si elles existent mais non observées ici, ne sont pas un obstacle à l'accouplement. S'il existe des barrières reproductives entre ces deux taxons elles ne se situent pas en amont de l'accouplement et vraisemblablement pas pendant l'accouplement qui dure longtemps entre les deux espèces sans signe d'incompatibilité. Nous avons observé par ailleurs sur la station où un accouplement mixte a été observé un individu d'habitus inhabituel (JSTR08062_0101 figure 23) qui pourrait correspondre à un « hybride » entre les deux taxons. Je l'ai séquencé en COI uniquement et il se place avec le groupe *E. cyanea/E. dominulus*. Il sera intéressant de regarder comment se place ce spécimen ainsi que les adultes issus de croisements mixtes dans l'arbre nucléaire ITS qui semble mieux différencier ces deux taxons d'après mes résultats préliminaires.

Les accouplements entre plusieurs espèces d'*Eurydema* ne sont pas rares. Un article relate l'accouplement entre *E. ornata* et *E. oleracea* qui appartiennent au même sous-genre *Eurydema* (Reymonet et Lupoli, 2017). Dans ce cas, des œufs et des larves viables ont été observés ainsi que des F1 d'habitus intermédiaire entre les deux espèces. Jung et al. (2011) indiquent que des croisements interspécifiques existent dans la nature entre *E. dominulus* et *E. gebleri*. Les croisements entre les deux sous-espèces d'*E. gebleri* ont été féconds et les adultes obtenus avaient le phénotype d'*E. g. gebleri*

qu'ils soient issus d'une femelle d'*E. g. gebleri* ou d'une femelle d'*E. g. rugosa*. Il est pourtant à souligner que l'observation d'accouplements interspécifiques naturels chez les Héteroptères est relativement rare car des barrières se mettent en place progressivement au cours de la spéciation.

Pour conclure ce cas passionnant, *E. cyanea* et *E. dominulus* se différencient essentiellement par leur patron de coloration très tranché, qui pourrait être lié à des conditions de températures liées à l'altitude. On observe des accouplements mixtes et des individus d'habitus intermédiaires dans les zones où les deux espèces se côtoient. Ceci étant des comportements similaires ont été observés au sein du genre *Eurydema* entre des espèces mieux différenciées y compris génétiquement (par exemple *E. ornata* x *E. oleracea*, *E. gleberi* x *E. dominulus* etc.), dont aucun taxonomiste ne remettrait en cause les statuts d'espèces. Dans ces conditions il est prématuré de proposer une synonymie ou un statut de sous-espèce pour *E. cyanea* par rapport à *E. dominulus*. Des élevages associés à des analyses génétiques sont nécessaires. S'agissant d'espèces univoltines, obtenir les générations successives indispensables nécessitera du temps et des enceintes climatiques adaptées, dont je ne disposais pas. L'étude de la température sur la coloration de ces taxons est également une option intéressante.

Statut taxonomique d'*E. herbacea* et d'*E. sea*.

Ces deux taxons sont un peu similaires au cas précédent : ce sont deux taxons très localisés à des biotopes particuliers et liés à des plantes hôtes particulières (l'extrême sommet des plages atlantiques où pousse *Cakile maritima* concernant *E. herbacea* et des milieux très secs où poussent les coussinets épineux d'*Hormathophylla spinosa* pour *E. sea*) et ils sont très proches génétiquement entre eux et de leur espèce-sœur ubiquiste *E. oleracea* (très largement répandue, jusqu'en Chine). *Eurydema herbacea* et *E. sea* pourraient représenter deux autres cas de spéciation écologique. Je n'ai pas disposé de suffisamment de matériel pour pouvoir tester les différents gènes sur ces taxons, que le COI sépare avec des distances génétiques toutefois très faibles (1,1 % entre *E. herbacea*/*E. oleracea* ; 0,8 % entre *E. sea*/*E. oleracea* et 1,3 % entre *E. herbacea*/*E. sea*), inférieures par exemple aux 4,5% observés entre *E. oleracea* et *E. ornata* ou entre les deux clades d'*E. ornata*. Des études moléculaires sur un nombre bien supérieur de spécimens plus représentatifs de la distribution de ces taxons seront nécessaires pour discuter de leur statut.

Deux espèces cryptiques sous le nom d'*E. ornata* ?

Toutes les clés d'identifications morphologiques confondent sous le nom *E. ornata* deux clades nettement séparés par le code-barres COI et distants de 4,7 %, l'un correspondant aux spécimens ibériques et marocains, l'autre à ceux de France, Grèce et Crète. Cette distance est du même niveau que celle observée entre *E. oleracea* et ces deux clades (5,5 et 4,1 % respectivement). A titre exploratoire, j'ai recherché des différences morphologiques entre ces deux clades sans toutefois en trouver, notamment au niveau des genitalia mâles. Par ailleurs l'espèce des Canaries *E. lundbaldi* se branche avec le clade ibérico-marocain dont il est relativement proche avec une distance de 2,5% (vs 4,7% avec

le clade franco-grec). On observe donc une différenciation géographique assez nette dont la barrière pourrait être les Pyrénées. Cette structuration avait échappé jusqu'à présent aux nombreux entomologistes qui ont étudié le genre *Eurydema*. Le Cytb donne le même résultat mais ce n'est pas le cas des gènes nucléaires étudiés : le gène 28S ne permet pas de distinguer ces deux clades. Les résultats donnés par l'ITS sont plus difficiles à comprendre : il place deux spécimens de Corse (JSTR02943_0101 et 0103) dans un clade peu soutenu regroupant les spécimens d'Espagne et du Maroc et un autre (JSTR02943_0102 du même échantillon) avec les spécimens de France. Ces trois spécimens sont tous trois placés dans le même clade avec le COI bien qu'avec des séquences qui diffèrent quelque peu les unes des autres.

N'ayant pas anticipé ce problème, l'échantillonnage n'a pas été orienté en vue de le résoudre. Pour aller plus loin dans la compréhension de ce taxon, il faudrait l'augmenter, notamment autour de la méditerranée aussi bien en Europe qu'en Afrique du Nord et en particulier au niveau de la chaîne Pyrénéenne, zone de séparation potentielle. Parfois la possibilité d'identifier deux taxons grâce à des marqueurs génétiques moins subjectifs que des caractères morphologiques subtils permet, dans un second temps, de trouver des différences morphologiques pertinentes entre les clades moléculaires distingués. C'est ce qui a été fait avec le genre *Carpocoris*, autre Pentatomidae. Ainsi Ribes et al. (2007) ont établi une synonymie entre *C. mediterraneus* et *C. fuscispinus* (n'ayant pas trouvé de caractères morphologiques pertinents pour séparer ces deux taxons) qui fut ensuite réfutée car des éléments morphométriques (forme du pronotum) ont été trouvés par Lupoli et al. (2013) en complément d'une différenciation nette des deux groupes en code-barres. Pour notre cas, seule une analyse par points homologues a été faite et n'a pas apporté d'élément concluant. En plus d'analyses génétiques complémentaires, d'autres investigations morphométriques pourraient être tentées sur un nombre plus important et diversifié de spécimens. Enfin comme précédemment des élevages et divers croisements pourraient être également utiles. À ce stade il est impossible de statuer sur la base du peu d'éléments que j'ai à disposition. Toutefois cette question est la seule soulevée par mon étude qui pourrait avoir une importance agronomique notable si ces différences génétiques s'accompagnent de différences biologiques ayant des conséquences appliquées. Par conséquent, la poursuite de cette étude sur plus d'individus et en zones particulières comme la chaîne des pyrénées s'avère nécessaire.

Diversité cryptique au sein d'*E. fieberi*.

Je n'ai pu disposer que de peu de spécimens d'*E. fieberi* et de son espèce jumelle *E. rotundicollis* avec laquelle il est souvent difficile de la séparer morphologiquement. Je m'attendais de ce fait à trouver peu de différences génétiques entre les deux. Les résultats obtenus sont très différents. Les spécimens d'*E. fieberi* de Grèce sont nettement séparés de ceux d'Espagne et de France bien que ces derniers se groupent avec *E. rotundicollis* qui se branche avec *E. fieberi* de France. Les nœuds sont bien soutenus et les distances génétiques élevées (5,8% entre les spécimens de France et d'Espagne ; 5,6% entre France et Grèce ; 6,9% entre Espagne et Grèce). Par contre, la distance entre les spécimens

de France d'*E. fieberi* et d'*E. rotundicollis* est de 1,9 % à peine. J'ai eu beaucoup de mal à me procurer des spécimens de ces deux espèces d'altitude relativement rares et tous les individus d'*E. rotundicollis* que j'ai pu séquencer proviennent des Alpes françaises, ainsi que les spécimens d'*E. fieberi* de France. Il serait bien évidemment intéressant d'arriver à séquencer des spécimens de ces deux espèces des Pyrénées, des Causses du Languedoc et du Mont Ventoux. Malgré des prospections ciblées en 2018 et 2019, aucun spécimen n'a pu être trouvé dans ces stations pourtant connues pour héberger l'espèce.

Mon échantillonnage trop réduit ne me permet pas d'aller plus loin mais une hypothèse forte est que les populations d'*E. fieberi* de Grèce, d'Espagne et de France puissent être des taxons différents. Le statut d'*E. rotundicollis* mis en synonymie avec *E. fieberi* (Fieber, 1861 puis Horvath, 1911 et Dupuis 1951) puis réhabilité par la plupart des auteurs, nécessite aussi d'être revu. *Eurydema fieberi* notamment signalée en Iran, aussi bien qu'*E. rotundicollis* ont des répartitions bien plus étendues en Europe que nos quelques stations de montagne et leur étude nécessite d'étendre considérablement l'échantillonnage. Si le statut d'espèce devait être reconnu pour les différents clades d'*E. fieberi* mis en évidence, cela nécessitera d'étudier parallèlement *E. rotundicollis* dans les différents pays de l'aire géographique où ces entités coexistent. Il n'est pas exclu que l'on découvre la même structuration chez *E. rotundicollis* et il en découlera potentiellement une cascade de synonymies qu'il sera très complexe de débrouiller... Quoiqu'il en soit l'appartenance de ces deux taxons au même sous-genre *Horvatheurydema* comme rectifié par Aukema et al. (2013) ne fait aucun doute.

Deux espèces non identifiables actuellement *E. spectabilis* et *E. eckerleini*.

Eurydema spectabilis est inféodée aux Brassicaceae de bord de mer sableux et se trouve en Grèce (dont en Crète), et dans plusieurs pays des Balkans (Heiss, 1983) ; *E. eckerleini* est monophage sur câprier et endémique de Crète avec une citation incertaine dans le Péloponnèse (Derjanschi et Péricart, 2005). Elle a été depuis signalée en Turquie (Rider, 2006) et dans les Cyclades (Sinoglou et Dioli, 2017). Les deux espèces sont placées dans des sous-genres différents : *Rubrodorsalium* pour *E. spectabilis* et *Eurydema* pour *E. eckerleini*.

J'ai pu obtenir des spécimens de Crète tous collectés sur câprier : ceux prélevés à l'ouest de l'île par J.-C. Streito ont été identifiés par lui-même comme *E. spectabilis* ; ceux prélevés à l'est de l'île par R. Lupoli (spécialiste des Pentatomidae) comme *E. eckerleini*. Après réexamen des vouchers de J.-C. Streito et discussion avec R. Lupoli, il ne fait aucun doute que l'ensemble de ces spécimens appartient à une seule et unique espèce. Je n'ai donc séquencé qu'une seule espèce qui présente une variabilité intraspécifique de 0,5 % d'une extrémité de l'île à l'autre. Ces spécimens présentent les caractéristiques morphologiques suivantes : dos de l'abdomen essentiellement rouge, absence de spinules sous le scutellum et le pronotum, paramères mâles à lame longue et fine. Ils présentent donc les caractères du sous-genre *Rubrodorsalium* et non ceux d'*Eurydema* (dos abdomen noir, spinules absents lame du paramère variable). Avec la clé de Derjanschi et Péricart (2005), ils sont assignés sans ambiguïté à *E.*

spectabilis mais leur biologie correspond à celle d'*E. eckerleini*. Par ailleurs *E. eckerleini* est placé avec les espèces dont le dessus de l'abdomen est noir conformément au sous-genre dans lequel il est positionné ce qui est en totale contradiction avec la réalité puisque Derjanschi et Péricart (2005) indiquent dans la diagnose de cette espèce que le dos de son abdomen est rouge. Pour compliquer les choses, Sinoglou et Dioli (2017) mentionnent comme critère de reconnaissance entre les deux espèces la taille plus grande de la tache noire de l'apex de l'hémélytre chez *E. eckerleini* et quelques différences au niveau de la lame du paramère, sans toutefois les illustrer ce qui rend l'identification totalement impossible. Les spécimens étudiés ici ont une tache noire apicale grande conforme à *E. eckerleini* d'après ces deux auteurs. Dans ces conditions il ne reste plus que l'examen des types de ces deux taxons pour mettre un nom sur mes spécimens. Celui d'*E. spectabilis* est au Hungarian Natural History Museum (Budapest, Hongrie), celui d'*E. eckerleini* au Zoological Institut of the Bulgarian academy of Sciences (Sofia, Bulgarie). Un examen approfondi du dos de l'abdomen et des spinules internes ainsi que des paramères des mâles est nécessaire mais détruirait les spécimens types. Les musées n'accepteront sans doute pas un tel examen et la résolution de ce problème taxonomique est hors sujet du projet IMPULSe concernant deux espèces non présentes en France. Dans l'impossibilité de choisir un des deux noms j'ai conservé les deux identifications contradictoires. Mes résultats ne mettent donc pas en évidence une synonymie potentielle mais simplement des difficultés d'identifications.

Placement d'*E. gleberi* dans un sous-genre

Derjanschi et Péricart (2005) placent *E. gleberi* dans le sous-genre *Eurydema*. La diagnose qu'ils donnent de cette espèce correspond bien à ce sous-genre : dos de l'abdomen noir, des spinules sous le pronotum et des paramères semblables à ceux d'*E. ornata*. Dans notre étude du gène COI, *E. gleberi* se place aux côtés du complexe *E. dominulus* / *E. cyanea*, donc dans le sous-genre *Rubrodorsalium* avec des BP assez élevés. Le seul spécimen séquencé pour le 28S se place par contre dans le sous-genre *Eurydema* comme attendu. Zhao et al. (2017b) ont séquencé une trentaine de spécimens d'*E. gleberi* de Chine sur le gène COI qui se placent également avec *E. dominulus* et *E. marancandica* deux espèces du sous-genre *Rubrodorsalium*. Ils n'ont pas séquencé d'autres gènes. Jung et al. (2011) relatent par ailleurs qu'*E. gleberi* se croiserait avec *E. dominulus* ce qui accrédirait l'hypothèse qu'*E. gleberi* est mal positionnée dans le sous-genre *Eurydema* et serait plus à sa place avec les espèces du sous-genre *Rubrodorsalium*.

Discussion

Le séquençage du gène COI a mis en évidence des problèmes taxonomiques non attendus au niveau du genre *Eurydema*. Seul le complexe *E. dominulus* / *E. cyanea* était représenté correctement au niveau du COI, ainsi que les deux clades géographiques d'*E. ornata*. Mais tous les tests préliminaires moléculaires et morphométriques effectués montrent que le nombre d'échantillons est insuffisant, surtout en ce qui concerne les complexes d'espèces comme *E. oleracea* et *E. ventralis*, *E. spectabilis*...

J'ai pu compléter mon échantillonnage dans la dernière année de mon diplôme mais par manque de temps et de budget, le séquençage de gènes supplémentaires ainsi que les photographies nécessaires aux analyses de morphométrie de contour n'ont pas pu être réalisés.

Au niveau de certains complexes d'espèces, l'ajout de gènes a i) apporté des éléments supplémentaires qu'il faut approfondir pour résoudre le complexe *E. dominulus/E. cyanea* (même si le nombre de spécimens amplifiés et séquencés pour les autres gènes que le COI n'est pas suffisant et ii) étayé l'existence de deux groupes géographiques bien distincts au niveau de *E. ornata* entre lesquels la distance génétique est proche de celle entre espèces différentes. Mais il aurait été intéressant également de séquencer plusieurs gènes pour l'ensemble des espèces d'*Eurydema* ainsi que les outgroups pour comparer les résultats trouvés avec COI. Dans tous les cas, il faut augmenter l'échantillonnage de façon significative pour avoir une bonne représentation géographique.

Il est possible que le choix des gènes soit à discuter. En effet, d'après la publication faite par Zhao et al. (2019) à partir de l'étude des génomes mitochondriaux complets, il apparaît que les fragments COI et Cytb sont les gènes les plus conservés dans le génome mitochondrial. Il aurait été intéressant d'utiliser pour différencier *E. cyanea* et *E. dominulus*, les gènes ATP8 (159 pb) ou ND2 (environ 990pb). ATP8 peut être utilisé pour analyser les relations intra-spécifiques selon Zhao et al. (2019), tandis que les quatre gènes COI, CO2, CO3 et Cytb sont utiles pour le code-barres. Le problème principal est que le gène ATP8 est très court (159pb) et que pour le gène ND2, peu d'amorces sont dessinées à part celles de Simon et al. (1994). Une autre possibilité aurait été de séquencer le génome mitochondrial complet. Selon Yuan et al. (2015), le génome mitochondrial est le marqueur génétique le plus utilisé pour étudier l'évolution et la génétique des populations d'insectes. Les régions qui sont riches en A + T présentent plusieurs caractéristiques distinctes (par exemple, la variation de taille), et ont un potentiel en tant que marqueurs moléculaires d'espèces ou de populations. D'après eux, les mitogénomes peuvent être utilisés efficacement pour résoudre les relations phylogénétiques des insectes Pentatomorphes à différents niveaux taxonomiques, en particulier chez les espèces étroitement apparentées.

Les séquences d'ADN ribosomique 28S partielles (en raison des difficultés techniques pour amplifier et séquencer la longueur totale d'environ 3000pb) ont été utilisées comme marqueurs moléculaires pour résoudre les relations phylogénétiques d'Heteroptera (nœuds basaux en particulier) pendant deux décennies (Yu et al., 2013). Chez *Eurydema*, le gène 28S n'apporte pas d'éléments déterminants si ce n'est qu'il permet de différencier sans ambiguïté les différents sous-genres d'*Eurydema* (*Eurydema*, *Horvatherydema* et *Rubrodorsalum*).

Les genitalia peuvent représenter des barrières reproductives pré-zygotiques plus ou moins importantes et ont donc un poids évolutif que l'on juge plus fort que la coloration. En permettant d'évaluer les possibilités d'hybridation entre formes, elles peuvent aider à préciser un statut spécifique de façon fiable et opérationnelle. Chez *Eurydema*, il existe des hybridations interspécifiques naturelles ou en laboratoire

(*E. ornata*/*E. oleracea*, *E. dominulus*/*E. gebleri* par exemple). Les paramères et les pièces génitales mâles sont peu différentes et ne sont pas un obstacle pour les copulations prolongées. Malgré tout, des différences très subtiles nous ont peut-être échappé et il serait nécessaire de réexaminer de manière plus critique sur un nombre plus important de spécimens ainsi que tous les échantillons déjà étudiés.

Des tests d'hybridations et de croisements seraient également très intéressants à mettre en place ainsi que des élevages permettant de s'assurer d'utiliser des femelles vierges dans les accouplements, de pouvoir réaliser des croisements dans les deux sens et si la génération F1 est viable, de voir si les générations F2 continuent à être viables et à s'hybrider avec les spécimens des espèces d'origine. En plus de faire des croisements, des élevages pour tester l'effet de températures différentes sur le phénotype (couleur en particulier) permettraient de relier variabilité de coloration et températures extérieures comme par exemple dans le complexe *E. cyanea* (bleue) /*E. dominulus* (noire et rouge) où cela pourrait aider à décider si ce sont deux espèces différentes ou une seule avec un polymorphisme adaptatif de coloration (en lien éventuel avec un évitement de la prédation par les oiseaux en fonction de l'altitude).

Il arrive que des synonymies soient effectuées et ensuite réfutées car des éléments morphométriques ont été trouvés (voir l'exemple des *Carpocoris* ; Lupoli et al., 2013 suite à une synonymie de Ribes et al., 2007). Dans notre cas, aucune étude sur la morphologie de la forme (analyse de Fourier) n'a été effectuée ; et l'analyse par points homologues menée n'a pas apporté d'éléments décisifs. Toutefois, le manque de spécimens est, là encore, à déplorer et il est possible que des différences n'aient pas été mises en évidence.

Dans un article sur les espèces de *Plutella* (Perry et al., 2018), une forte divergence génomique et phénotypique dans des mitochondries a été trouvée dans la nature, ce qui confirme leur statut d'espèces distinctes malgré leur capacité à s'hybrider. L'isolement reproductif a probablement évolué au cours de la spéciation allopatrique, et les données de séquence à l'échelle du génome suggèrent qu'il a été maintenu à la suite d'un contact secondaire. La variation de l'infection par *Wolbachia* pourrait aussi être un facteur renforçant les barrières reproductives. Dans notre cas, les mitochondries donnent l'impression qu'elles sont identiques, mais nous ne connaissons pas les bactéries inféodées à notre complexe d'espèces. Il serait, par conséquent, intéressant de creuser cette possibilité. En effet, avec les séquençage nouvelle génération, un nombre considérable de séquences est disponible. En fonction de la problématique de départ, les filtres peuvent permettre de déterminer les bactéries ou autres parasites ou endosymbiontes ou même parasitoïdes qui sont inféodés aux insectes. Dans notre cas, après analyse des résultats de NGS, nous avons ainsi découvert parmi nos échantillons des séquences du parasitoïde *Clytiomya*. Il s'agit d'une information supplémentaire importante car les parasitoïdes peuvent être utilisés en lutte biologique, et la base de données Arthemis ne contient pas d'informations concernant ce genre.

Chapitre III : Modèle Biologique n°2

Le genre *Lygus* Hahn, 1833

A/-Contexte général : Le genre *Lygus*

1. Définition et diversité du genre *Lygus*

Le genre *Lygus* a été décrit par Hahn (1833) pour l'espèce type *Cimex pratensis* L., 1758. Il appartient à la sous-famille des Mirinae et à la tribu des Mirini. Pendant 200 ans, ce genre a accueilli de nombreuses espèces de toute évidence très différentes et mal placées (Yasunaga et al., 2018). Pour cette raison, Schwartz et Footitt (1998) l'ont qualifié de genre « poubelle » ! Schwartz et Footitt (1998) ont révisé le genre et mis de l'ordre dans les espèces néarctiques, le travail se poursuit concernant les espèces asiatiques (Yasunaga et al., 2018) et les espèces Européennes ont été révisées par Aglyamzyanov (2006, 2009). Le nom *Lygus* est resté relativement stable et ne connaît que peu de synonymes. Ceux-ci sont listés par Kerzhner et Josifov (1999).

J'adopte ici la conception restreinte du genre donnée par Schwartz et Footitt (1998). La figure 24 donne les principaux caractères pour définir et illustrer les *Lygus*.

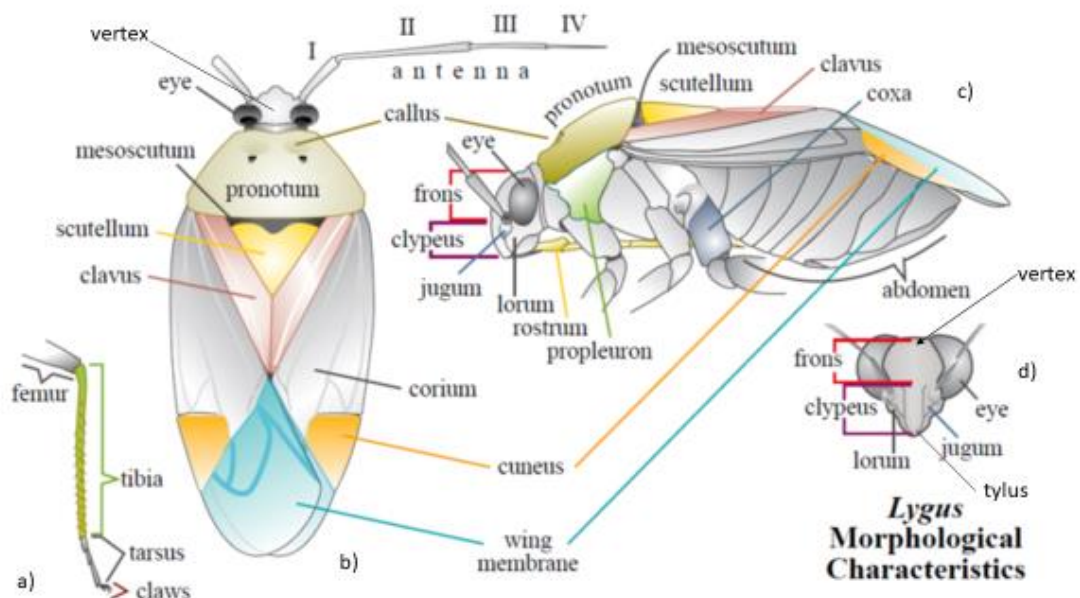


Figure 24 : Schéma des principaux caractères morphologiques utilisés pour décrire les espèces du genre *Lygus*. (a) Représentation d'une patte. (b) Vue dorsale. (c) Vue latérale. (d) Représentation de la tête vue dorsale. (Extrait de Mueller et al., 2003).

Sur le terrain et par rapport aux différents genres de miridés que l'on trouve (*Adelphocoris*, *Closterotomus*), les *Lygus* ont des antennes plus courtes et sont plus petits et plus arrondis. La figure 25 décrit les principaux caractères de reconnaissance du genre *Lygus* observables dans la nature.

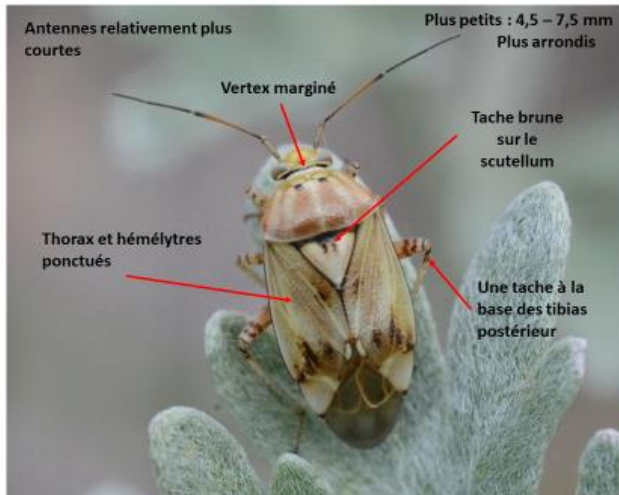


Figure 25 : Caractères de reconnaissance des *Lygus* dans un champ (J.-C. Streito).

Ainsi défini le genre *Lygus* comporte actuellement 163 espèces retenues dans le catalogue mondial des Miridae (Schuh, 2002-2013) qui ne prend pas en compte plusieurs publications et synonymies établies depuis. Il est probable que beaucoup d'espèces de cette liste seront encore déplacées dans les années qui viennent. Schwartz et Footitt (1998) considèrent qu'il s'agit d'un genre

holarctique. Ils excluent toutes les espèces d'Afrique, d'Asie du Sud-Est et Indopacifiques et ne retiennent que 29 espèces néarctiques, 20 espèces paléarctiques et 2 espèces holarctiques. Le catalogue Paléarctique liste suite à plusieurs révisions (Demchenko, 2004; Aglyamzyanov, 2003, 2005), 19 espèces (Kerzhner et Josifov, 1999, mis à jour par Aukema et al., 2013). L'Europe de l'Ouest comporte 7 espèces valides toutes présentes en France, figurées en gras et illustrées dans la liste des espèces paléarctiques ci-dessous. Ce sont ces 7 espèces que j'ai étudiées.

Lygus discrepans Reuter, 1906

***Lygus gemellatus* (Herrich-Schäffer, 1835) (a)**

Lygus hsiao Zheng and Yu, 1992

Lygus israelensis Linnavuori, 1962

***Lygus italicus* Wagner, 1950 (b)**

Lygus izyaslavi Aglyamzyanov, 1994

Lygus kerzhneri Qi and Nonnaizab, 1993

***Lygus maritimus* Wagner, 1949 (c)**

Lygus monticola Aglyamzyanov, 1994

Lygus orientis Aglyamzyanov, 1994

Lygus pachynemis Reuter, 1879

Lygus paradiscrepans Zheng and Yu, 1992

Lygus ponapensis Carvalho, 1956

***Lygus pratensis* (Linnaeus, 1758) (d)**

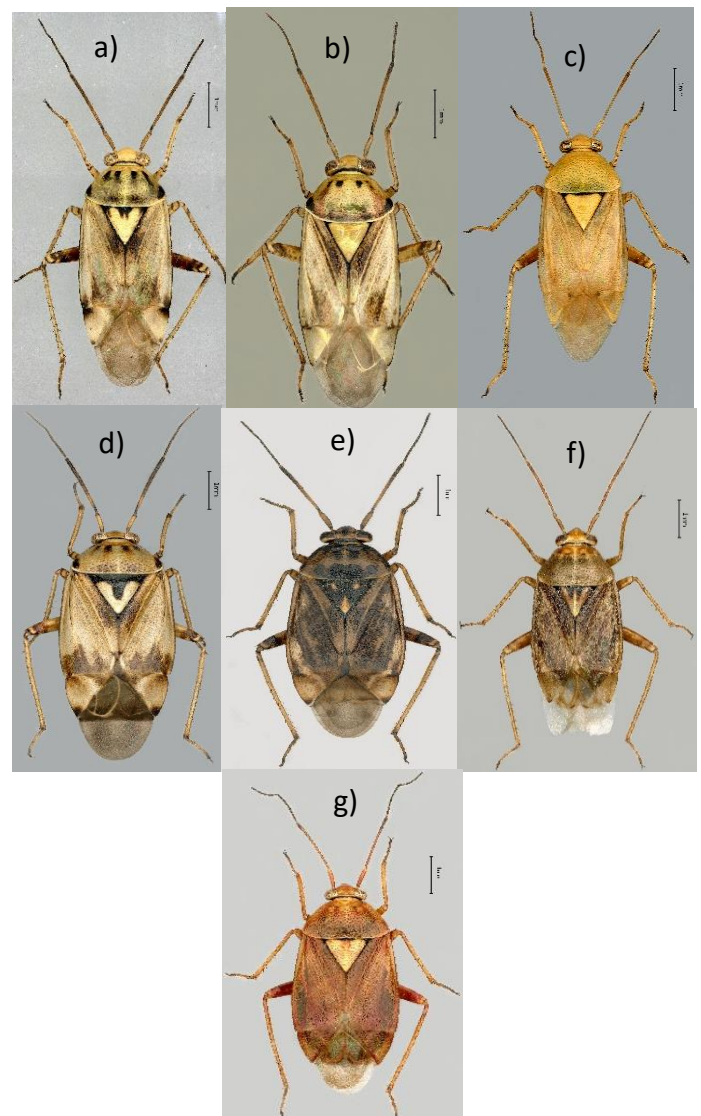
***Lygus punctatus* (Zetterstedt, 1838) (e)**

***Lygus rugulipennis* Poppius, 1911 (f)**

Lygus sibiricus Aglyamzyanov, 1990

Lygus tibetanus Zheng and Yu, 1992

***Lygus wagneri* Remane, 1955 (g)**



2. Importance agronomique du genre *Lygus*

Les dégâts engendrés par les *Lygus* sont bien connus en Amérique du nord (Otani et Carcamo, 2011 ; Cooper et Spurgeon, 2013 ; Hull et al., 2013 ; Burange et al., 2012 ; Gillespi et al., 2003). En Chine, les dégâts sont bien documentés également dans les champs de coton où *Lygus pratensis* fait des ravages énormes (Zhang et al., 2017). Leur émergence comme ravageurs en Europe est plus récente (une dizaine d'années). La majorité des publications traitant des dégâts (et notamment celles que je cite ci-dessous) concerne donc des espèces nord-américaines ou chinoises.

Les *Lygus* peuvent consommer toutes les parties molles des plantes mais préfèrent les organes reproducteurs ; ils endommagent de nombreuses plantes cultivées, notamment les légumineuses, les céréales et les vergers, ainsi que les plantes ornementales et médicinales (Saulich et Musolin, 2020). Ce sont des ravageurs polyphages des cultures légumières (Zhou et al., 2012) et les plantations les plus



Figure 26 : Dégâts de *Lygus* sur boutons floraux d'aubergines (J.-C. Streito)

sensibles sont : les fraises (Zhou et al., 2012 ; Swezey et al., 2013), les aubergines (Figure 26), les tomates, les concombres (Wynde et Port, 2012), les poivrons et les cultures semencières (Aglyamzyanov, 2006), et la luzerne (Wynde et Port, 2012 ; Erdelyi et al., 1994 ; <http://ephytia.inra.fr/fr/C/19729/Biocontrol-Degats> ; Schwartz et Footitt, 1998 ; Burange et al., 2012).

Les dégâts occasionnés sont de diverses natures en fonction du stade de développement de l'insecte et en fonction de la partie de la plante touchée et il semble que les larves occasionnent plus de dégâts sur les cultures que les adultes (Schwarz et Footitt, 1998). C'est toujours dans les parties aériennes de la plante que les dégâts se situent. Au niveau des feuilles, les premiers symptômes sont des petites taches marrons sur les jeunes feuilles. Toutes les cellules attaquées, ainsi que la zone les environnant,

meurent, et la plante ne peut plus se développer correctement. Lorsque les feuilles attaquées se développent, les perforations s'agrandissent et les feuilles deviennent rugueuses, bosselées et sans forme (<http://ephytia.inra.fr/fr/C/19729/Biocontrol-Degats>). Les fruits avortent lorsque les fleurs sont endommagées, et la croissance des plantes stagne lorsque l'apex des plantes est attaqué. Au niveau des tiges, une partie de l'épiderme peut être détruite, entraînant la sécrétion de gomme par la plante. La

croissance des pousses est alors réduite et l'apex reste recroquevillé (<http://ephytia.inra.fr/fr/C/19729/Biocontrol-Degats>).

En plus des dégâts directs liés aux piqures de nutrition, *Lygus pratensis* est connu comme vecteur de nombreux agents pathogènes des plantes (Saulich et Musolin, 2020), en particulier la marbrure de la pomme de terre, le virus de la luzerne, la brûlure bactérienne du haricot et les virus de la mosaïque de la betterave (Puchkov, 1966). Selon Aglyamzyanov, (2006), il existe également une zoophagie occasionnelle chez les espèces de *Lygus*. Ainsi, il a constaté que *L. rugulipennis* était capable de se nourrir à partir d'œufs du lépidoptère (*Mamestra brassicae*) ou encore du doryphore de la pomme de terre (*Leptinotarsa decemlineata*).

Les agriculteurs et les techniciens agricoles confondent très souvent plusieurs espèces et il est difficile d'attribuer des dégâts à telle ou telle espèce de Miridae (Piemontese et al., 2020). Les *Lygus* sont très souvent confondus avec d'autres espèces. Nous avons pu le constater au cours du projet Impulse. Par exemple, sur fraises, les dégâts attribués à des *Lygus* sont en fait occasionnés par *Liocoris tripustulatus* (J.C. Streito com. pers.) mais c'est également le cas sur aubergines où cohabitent des *Adelphocoris* et des *Closterotomus* qui sont souvent confondus avec le genre étudié (J.C. Streito com. pers.). À l'intérieur du genre *Lygus*, il est difficile de nommer un individu et d'identifier l'espèce au champ. Cela ne peut se faire qu'en laboratoire par des spécialistes et encore avec beaucoup d'incertitudes (Schwartz et Footitt, 1998). Ainsi, en raison de la difficulté à diagnostiquer les insectes jusqu'à récemment, l'espèce *Lygus rugulipennis* et d'autres ont été mal identifiées. Par exemple, de nombreuses mentions de *Lygus pratensis* L. d'Angleterre et de *L. disponsi* Linnavuori du Japon font en fait référence à *L. rugulipennis* (Kerzhner et Josifov, 1999 ; Schaefer et Panizzi, 2000 ; Saulich et Musolin, 2020). On a donc du mal à évaluer précisément qui est responsable des dégâts rapportés aux *Lygus* or il est important dans le cadre d'une santé durable des cultures de pouvoir caractériser les punaises du genre *Lygus* pour pouvoir mettre en œuvre des moyens de lutte efficaces. Les espèces de *Lygus* de la région Paléarctique ont jusqu'à présent fait l'objet de recherches insuffisantes. L'une des causes en est que de nombreuses espèces de *Lygus* sont très proches morphologiquement, ce qui rend leur diagnostic difficile.

3. Biologie et Cycle biologique du genre *Lygus*

Tout comme l'évaluation des dégâts, la biologie des espèces de *Lygus* est souvent entachée d'incertitude liée à la difficulté d'identifier les espèces. Il a été démontré qu'en fonction de la température, le cycle biologique du genre varie et passe d'univoltin à plurivoltin. Par exemple, *Lygus rugulipennis* passe d'une génération par an au nord de l'Europe (en Ecosse et en Suède), à deux dans une grande partie du paléarctique (Roumanie, Hongrie ; Puchkov, 1966) et jusqu'à quatre dans le sud du paléarctique (Italie; Asanova et Iskakov, 1977) et au Japon (Hori et Hanada, 1970). Mais c'est également le cas de *Lygus lineolaris* qui passe d'une génération au Canada à quatre dans le sud des USA (Strong et al., 1969 ; Kelton, 1975 ; Snodgrass et al., 2012).

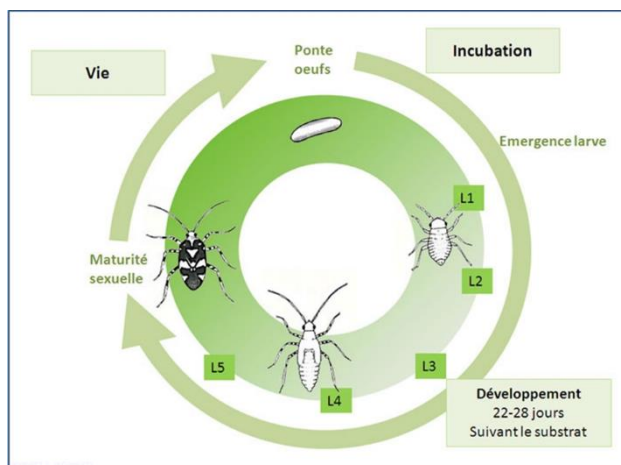


Figure 27 : Cycle de développement d'une génération de *Lygus rugulipennis* (<http://ephytia.inra.fr/fr/C/19730/Biocontrol-Biologie>).

En Europe, selon les zones climatiques, les espèces de *Lygus* développent 2 à 3 générations par an (Aglyamzyazov, 2006). En France, la biologie des *Lygus* n'est pas bien connue mais elle semblerait être la même que pour les espèces américaines : deux générations par an sont observées en conditions naturelles mais sous serre, il peut y en avoir davantage

(<http://ephytia.inra.fr/fr/C/19730/Biocontrol-Biologie>). Le cycle de *L. rugulipennis* est décrit sur le graphe (Figure 27). Généralement, les

punaises adultes passent l'hiver en diapause dans les fissures d'écorce ou entre les feuilles mortes. Au printemps (avril - mai), elles sortent de diapause et commencent à se nourrir et se reproduire sur les parties jeunes des plantes. Les œufs, environ 100 par femelle, sont déposés dans les tiges et les boutons floraux de la plante hôte. Les larves écloses se développent sur les plantes-hôtes via cinq stades larvaires. Les larves deviennent adultes en été et la génération suivante se développe. Les larves de la nouvelle génération atteignent leur maturité en automne, après quoi elles se mettent à la recherche d'un endroit pour hiverner. En automne, les insectes adultes peuvent se cacher et passer l'hiver dans les serres. Lorsque les adultes sortent de leur diapause au printemps, ils deviennent très actifs et sont capables de voler sur de longues distances (Saulich et Musolin, 2020) pour aller jusqu'à de nouvelles plantes hôtes (ou jusque dans les serres ; <http://ephytia.inra.fr/fr/C/19730/Biocontrol-Biologie>). Il peut exister différentes générations en même temps sur une même plante (Saulich et Musolin, 2020) mais également différentes espèces de *Lygus* (Gillespie et al., 2003). Des populations mixtes de *L. rugulipennis*, *L. gemellatus* et *L. pratensis* ont été observées durant le projet Impulse.

4. Variations morphologiques saisonnières dans le genre *Lygus*

Les changements morphologiques saisonniers sont l'une des manifestations de la variabilité intra-population des *Lygus*. Ainsi, Schwartz et Footitt (1998) signalent que chez *L. punctatus* la génération estivale est uniformément pâle alors que la génération hivernante est foncée. Aglyamzyanov (2006) décrit la variation saisonnière du motif noir sur le scutellum et illustre des différences du dessin en W du scutellum entre les générations pour *L. gemellatus* : dans la génération hivernante, après et avant la diapause, les dessins noirs sont plus prononcés que dans la génération estivale. Cette variabilité et surtout l'intensité du dessin noir a été étudiée par Graham et Carranza (1983) en soumettant *L. elisus* à des températures différentes constantes. Il s'est avéré qu'il y avait une dépendance directe entre l'intensité de la coloration et la température, en particulier chez les larves du dernier stade de développement. L'effet de la température sur la coloration est plus fort chez les mâles que chez les

femelles (Aglyamzyanov, 2006 ; Schwartz et Footit, 1998). En règle générale, les imagos (adultes) de la génération estivale ont une couleur plus claire ou une coloration du corps jaune verdâtre et avec les changements ultérieurs (maturité, température...), la couleur a tendance à s'intensifier et la coloration spécifique de l'espèce à s'assombrir (Aglyamzyanov, 2006).

Le polyphénisme saisonnier et les réponses contrôlant les traits morphologiques et physiologiques (coloration, forme, taille et proportions des parties du corps, degré de développement des ailes, etc.) sont souvent étroitement liés à la diapause ou à une autre forme de dormance saisonnière (Saulich et Musolin, 2020). Dans la littérature, le rôle de l'hybridation dans la variabilité des espèces de *Lygus* a aussi été discuté mais il n'y a pas de cas avéré. Graham (1982) a pensé réussir l'hybridation de *L. desertinus* et *L. elisus*, mais il a été prouvé plus tard qu'il s'agissait de variantes de coloration de la même espèce (Schwartz et Footit, 1998).

5. Taxinomie des espèces ouest-européennes du genre *Lygus*

Pour mon étude je n'ai retenu que les espèces d'Europe de l'Ouest : les trois espèces collectées dans des inventaires préliminaires en cultures légumières auxquelles j'ai ajouté toutes les espèces présentes en milieu naturel, soit 7 espèces au total, de manière à avoir une vision d'ensemble du genre pour ma zone d'étude. Pour compléter, j'ai additionné des échantillons d'espèces américaines disponibles au laboratoire (*L. elisus*, *L. bradleyi*, *L. lineolaris* et *L. vanduzeei*).

Lygus gemellatus (Herrich-Schäffer, 1835)

Demchenko (2003) a mis en synonymie *L. adspersus* (Schilling, 1837) avec *L. gemellatus*. Cette synonymie est importante car elle remet en cause un critère important des clés d'identification : la présence d'un W foncé sur le scutellum (absent chez *L. gemellatus* mais présent chez *L. adspersus* considéré à présent comme la même espèce, voir Aglyamzyanov, 2006).

Lygus gemellatus est une espèce très commune et largement répandue dans toute l'Europe, notamment depuis qu'elle a intégré *L. adspersus*. Considérée comme absente du Royaume-Uni, elle est connue aussi d'Afrique du Nord et d'Asie (Kerzhner et Josifov, 1999). Elle s'observe régulièrement dans les cultures notamment maraîchères en France (Streito com. pers).

Lygus italicus Wagner, 1950

Lygus italicus diffère de *L. gemellatus* et de *L. maritimus* essentiellement par une tache noire sur le tylus (Figure 24). Elle a une répartition plus réduite que *L. gemellatus*. Kerzhner et Josifov (1999) la signalent en Bulgarie, Croatie, France, Grèce, Italie, Espagne et Algérie auxquels il faut ajouter la Turquie et la Syrie (Aglyamzyanov, 2009). Pour la France, elle est citée dans le Var (Sainte-Baume) par Wagner et Weber (1964) et en Corse (Ehanno, 1987) où elle semble relativement commune (Streito com. pers).

Lygus maritimus Wagner, 1949

Wagner (1949) a d'abord considéré cette espèce comme une sous-espèce de *L. gemellatus* avant de l'élever au rang d'espèce. Elle est connue dans une douzaine de pays d'Europe de l'Ouest (Kerzhner et

Josifov, 1999 ; Aukema et al., 2013) ainsi qu'aux Canaries et à Madère et dans l'Ouest du Sahara. Sa principale originalité est d'être localisée essentiellement sur les façades maritimes le long de l'Atlantique (de la Suède au Sahara) et du nord de la Méditerranée (de l'Espagne à la Serbie). Le Royaume-Uni constitue une exception plutôt surprenante car elle y est abondante y compris à l'intérieur des terres (Southwood et Leston, 1959).

Lygus pratensis (Linnaeus, 1758)

Il s'agit de l'espèce type du genre *Lygus*. Plusieurs synonymes anciens sont donnés par Kerzhner et Josifov (1999). C'est une espèce très commune et largement répandue dans toute l'Europe, l'Afrique du Nord et jusqu'en Asie (Nord-Ouest de la Chine et Inde). Elle est très courante en France et une des principales espèces collectées sur les cultures légumières lors du projet IMPULsE.

Lygus punctatus (Zetterstedt, 1838)

Cette espèce est largement répandue en Europe, Asie et Amérique du Nord. Elle est considérée par Wagner et Weber (1964) et Ehanno (1987) comme une espèce boréo-montagnarde connue en France dans quelques stations des Alpes. Wagner et Weber (1964) la signalent en Andorre. Plusieurs spécimens identifiés comme *L. punctatus* dans la collection de J.-C. Streito proviennent des Pyrénées, des Vosges et du Jura.

Lygus rugulipennis Poppius, 1911

Il s'agit d'une espèce holarctique dont l'aire de répartition la plus vaste du groupe, comprend l'Amérique du Nord, toute l'Europe et l'Asie jusqu'au Japon et à la Corée à l'est. C'est un ravageur majeur en Amérique du Nord. En France, elle est commune partout et sur de nombreuses cultures. C'est, après *L. pratensis*, l'espèce la plus souvent collectée en cultures maraîchères durant le projet.

Lygus wagneri Remane, 1955

Cette espèce a une distribution boréo-montagnarde très similaire à celle de *L. punctatus*. Elle est décrite de nombreux pays d'Europe mais pas d'Amérique du Nord contrairement à *L. punctatus*. Elle est présente en Asie jusqu'en Corée. En France elle est connue dans les Alpes, les Pyrénées, le Jura, les Vosges et le Massif Central.

6. Identification morphologique des *Lygus* d'Europe de l'Ouest

Le genre *Lygus* est réputé pour être un genre dont l'identification des espèces est difficile (Southwood et Leston, 1959 ; Aglyamzyanov, 2006). Schwartz et Footitt (1988) en donnent la raison : beaucoup d'espèces sont morphologiquement similaires, les caractères taxonomiques sont ténus et subtiles et chez beaucoup d'espèces, il existe d'importantes variations intra-spécifiques d'origine géographique et ontogénétique (paragraphe 4 précédent). Après deux révisions très fouillées et relativement récentes (Schwartz et Footitt 1998 ; Aglyamzyanov 2006, 2009) les problèmes d'identification sur la base des critères morphologiques ne sont toujours pas résolus.

Pour ce chapitre, j'ai consulté toutes les clés d'identification des espèces de *Lygus* européens depuis Wagner (1952) que j'ai pu me procurer (Tableau 7) puis j'ai listé tous les critères morphologiques utilisés (paragraphe 7).

Tableau 7 : Tableau résumant les clés de détermination disponibles pour les 7 espèces françaises

Clé	L. gemellatus	L. italicus	L.maritimus	L. pratensis	L. punctatus	L. rugulipennis	L. wagneri
Wagner (1952)	X		X	X	X	X	
Stichel (1956)	X	X	X	X	X	X	X
Southwood & Leston (1959)			X	X	X	X	X
Wagner & Weber (1964)	X	X	X	X	X	X	X
Wagner (1971)	X	X	X	X	X	X	X
Vinokurov (1979)	X				X	X	X
Vinokurov et al. (1988)	X				X	X	X
Schwarz & Foottit (1998)	X	X	X	X	X	X	X
Zheng et al. (2004)	X			X	X	X	X
Aglyamzyanov (2006, 2009)	X	X	X	X	X	X	X
Rinalta & Rinne (2011)	X			X	X	X	X
Skipper (2013)	X		X	X		X	X
Taszakowski & Painska (2017)					X		X

Schwartz et Foottit (1998) sont parmi les rares auteurs à avoir discuté les caractères diagnostiques mais au final et à quelques détails près dans la clé des espèces paléarctiques, et en particulier pour les 7 espèces du présent travail, ils utilisent les mêmes critères que Wagner (1964). Enfin Aglyamzyanov (2006, 2009) n'a pas non plus apporté d'innovations dans l'identification des 7 espèces qui m'intéressent. Du coup, bien que nombreuses, les clés dont on dispose concernent souvent les mêmes critères, en définitive peu nombreux. Je les liste en précisant la valeur que leur accordent les différents auteurs lorsque cette appréciation est disponible. J'ai aussi demandé leur avis sur ces critères aux hétéroptéristes que j'ai rencontrés durant mon mémoire : Jean-Claude Streito (CBGP) et Armand Matocq (MNHN) un des meilleurs spécialistes des Miridae européens. C'est à partir de cette liste que je retiendrai les critères qui semblent les plus pertinents pour identifier mon matériel d'étude.

7. Caractères morphologiques utilisés pour identifier les 7 espèces de *Lygus* ouest-européennes.

7-1 Caractères morphologiques externes

Le dimorphisme sexuel chez les espèces du genre *Lygus* est peu important et peu intégré dans les clés d'identification car il concerne la couleur et quelques rares données morphométriques, caractères sujets à une variabilité individuelle et saisonnière très forte qui en définitive masque les différences entre sexes. Sauf mention contraire les caractères décrits ci-dessous concernent de manière identique les deux sexes.

1. Ponctuation des hémélytres (Figure 28) : corie avec une ponctuation uniforme et dense, sans espaces brillants non ponctués, *versus* partie distale de la corie avec une ponctuation moins dense et plus irrégulière que la partie basale, avec parfois des espaces lisses et brillants non ponctués. Ce critère est basal dans toutes les clés consultées et permet de séparer *L. rugulipennis/L. pratensis/L. wagneri* des

autres espèces. Son appréciation est parfois délicate et dépend beaucoup de l'éclairage, de l'orientation de l'insecte etc.

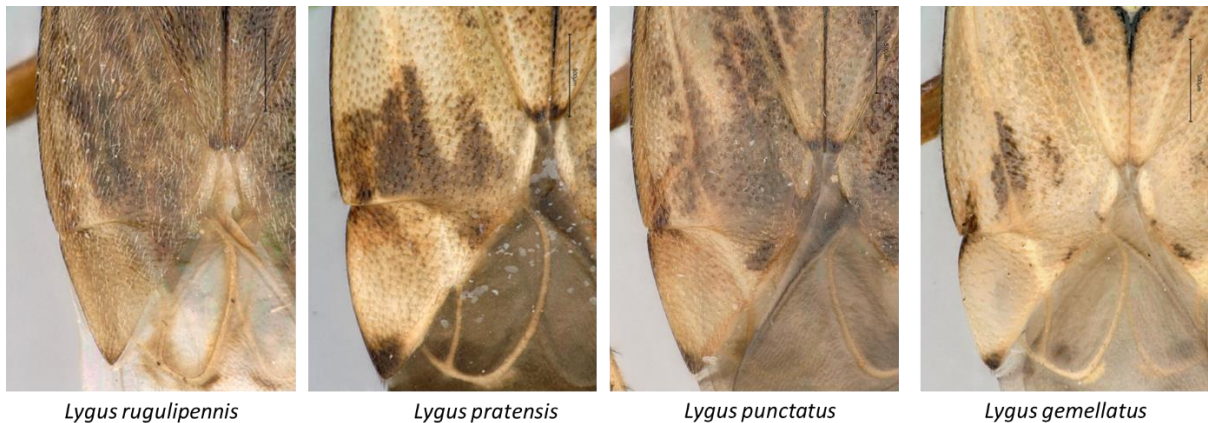
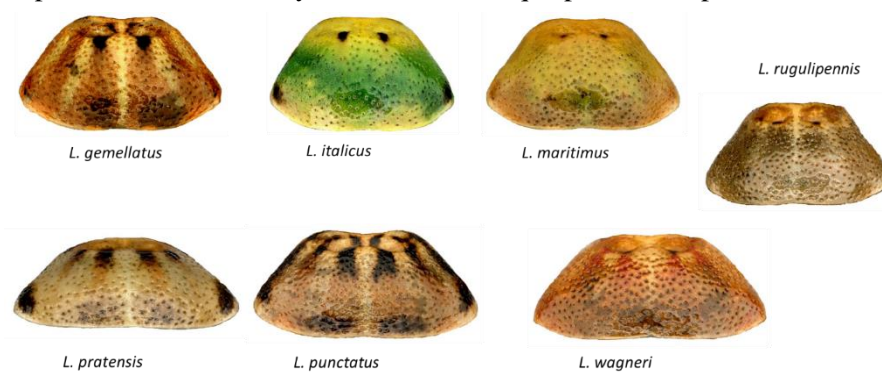


Figure 28 : Ponctuation hémélytrale régulière et forte chez les 2 premières et plus faiblement marquée sur les deux autres, avec des plages sans ponctuation chez *L. gemellatus*.

2. Différence de ponctuation entre le pronotum et les cories (Figure 29). Wagner (1971) introduit une différence entre le thorax et hémélytre qui sépare *L. rugulipennis* des autres espèces : ponctuation des hémélytres serrée sans espace libre, plus espacée sur le pronotum *versus* ponctuation identique sur le pronotum et les hémélytres. Le souci est que plusieurs espèces sont intermédiaires mais aussi que les



populations hivernantes ont tendance à être plus distinctement ponctuées que les populations estivales (Schwartz et Footitt, 1998).

Figure 29 : Ponctuation des pronotums des 7 espèces étudiées du genre *Lygus*.

3. Longueur et densité de la pilosité (vestiture) (Figure 30) : longue et dense particulièrement visible sur l'hémélytre chez *L. rugulipennis* qui a de ce fait un aspect mat *versus* plus fine et plus courte chez les autres espèces qui ont un aspect plus brillant. Schwartz et Footitt (1988) sont plus précis dans leur description de la pilosité dorsale et distinguent trois classes : 1. courte et éparse (les soies adjacentes ne se touchent pas) ; 2. modérément longue et distribuée (les soies adjacentes se touchent mais se

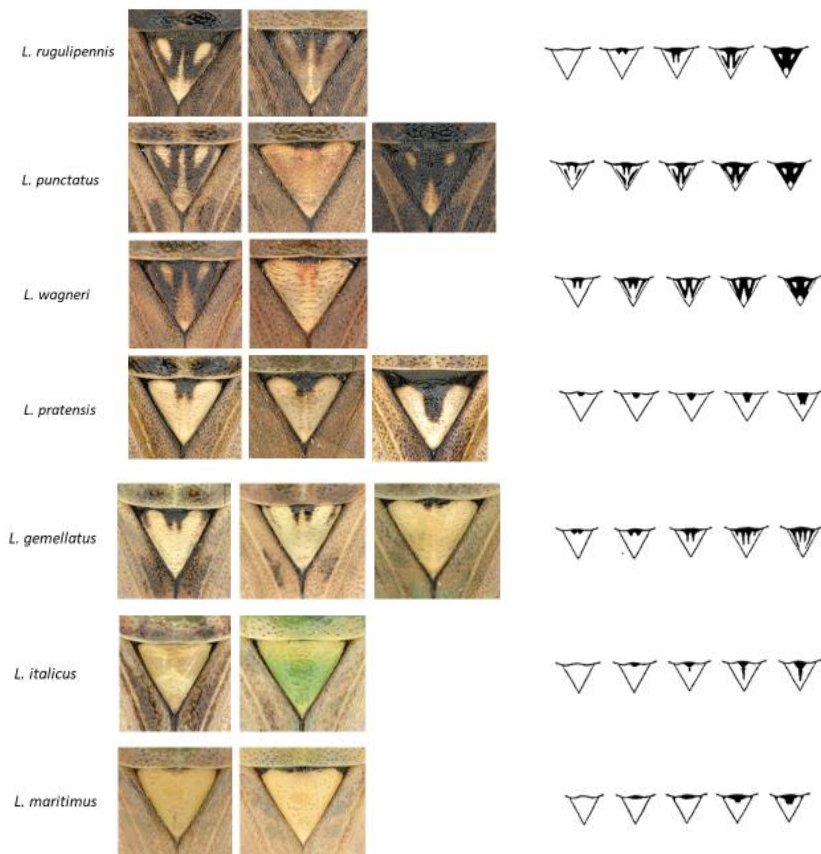


Figure 30 : Illustration de la différence de pilosité entre *L. gemellatus* et *L. rugulipennis*

chevauchent peu ; 3. longue et dense (les soies adjacentes se chevauchent largement). La difficulté vient de cette seconde catégorie. Si certains spécimens sont

clairement assignés à *L. rugulipennis* d'autres sont difficiles à assigner à une espèce ou à une autre. Des individus de *L. pratensis* notamment peuvent avoir une pilosité aussi longue et dense que certains *L. rugulipennis*. Ceci étant, c'est un caractère souvent pertinent et systématiquement utilisé pour distinguer *L. rugulipennis* des autres espèces.

4. Eunomie du scutellum (Figure 31). Le terme eunomie est défini pour la première fois par Wagner (1950) puis largement utilisé par Péricart (1990). Je l'utilise ici pour le dessin qui orne la face



dorsale du scutellum et qui varie de l'absence totale à un W plus ou moins foncé pouvant occuper quasiment toute la surface du scutellum. Wagner (1964) a dessiné les eunomies des 7 espèces qui nous intéressent (Figure 31). Ce caractère est utilisé par tous les auteurs. Aglyamzyanov (2006) complique encore la situation en plaçant des formes à scutellum tachées d'un W dans l'espèce *L. gemellatus* (*L. gemellatus* forme *adpersus* voir ma discussion paragraphe 5 à propos de la synonymie *L.*

Figure 31 : Représentation des différentes eunomies du scutellum chez les espèces de Lygus, à droite, les dessins extraits de Wagner et Weber (1964).

gemellatus = *L. adpersus*). Ces spécimens auraient été identifiés comme *L. punctatus* ou *L. wagneri* avec les clés de Wagner notamment.

5. La présence ou non d'une tache noire à l'apex du cunéus (Figure 32). Absent chez *L. wagneri*,

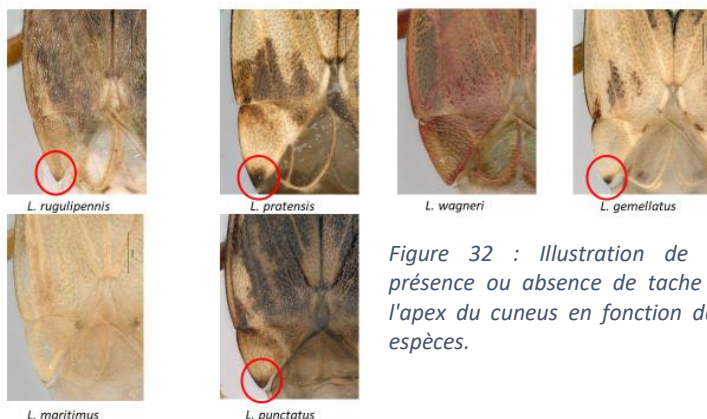


Figure 32 : Illustration de la présence ou absence de tache à l'apex du cuneus en fonction des espèces.

présent chez *L. pratensis*. À noter que Westwood et Leston (1959) utilisent ce critère pour séparer *L. rugulipennis* (occasionnellement noir à l'apex) versus presque toujours noir chez les autres espèces (*maritimus*, *pratensis*,

punctatus et *wagneri*) en contradiction avec Wagner et Weber (1964) qui notent l'absence de cette tache noire chez *L. wagneri*.

6. Coloration générale (Figure 33). La couleur foncière du dessus : rouge brunâtre, grisâtre à noirâtre chez *L. punctatus* versus gris verdâtre, jaunâtre ou jaune clair souvent avec des dessins rouges chez *gemellatus/maritimus/italicus*. Southwood et Leston (1959) utilisent aussi beaucoup la coloration



dans leur clé d'identification avec des descriptions beaucoup plus précises notamment en précisant la disposition des taches sur le pronotum et les élytres. Aglyamzyanov (2006) souligne que la couleur et notamment la répartition des taches sombres (sur la tête, le scutellum, les hémélytres etc.) est importante pour

Figure 33 : Représentation de la variation de coloration chez *L. punctatus*, *L. italicus*, *L. gemellatus* et *L. maritimus*.

l'identification mais sujette à d'importantes variations individuelles qui rend son utilisation difficile. Il préconise de réaliser systématiquement les identifications sur des séries de spécimens. Le souci est que dans une localité donnée on rencontre très souvent plusieurs espèces en mélange ! Dans le projet IMPULsE, la présence sur une même parcelle de *L. rugulipennis* et de *L. pratensis* par exemple a été constatée assez fréquemment (deux espèces assez différentes pour qu'on n'ait pas de doutes). Compte tenu de la variabilité intra-spécifique mais aussi saisonnière, les critères de coloration sont peu fiables mais permettent de faire des groupes de spécimens !

7. Coloration de la partie apicale de l'article II des antennes : largement noire chez *L. gemellatus*, versus claire ou étroitement noire chez *L. maritimus* et *L. italicus*

8. Tache noire au sommet du tylus (Figure 34) : chez *L. italicus* versus tylus clair ou seulement légèrement rembruni chez *L. maritimus/L. gemellatus*.

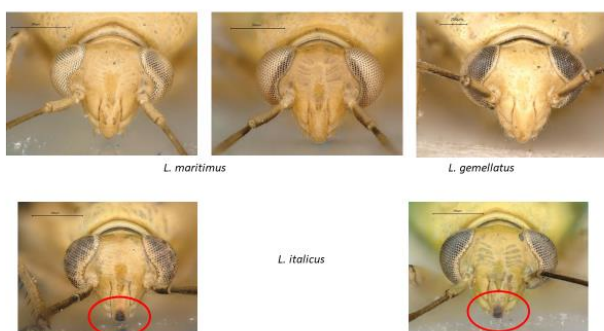


Figure 34 : critère de la tache noire sur le tylus des espèces *L. italicus*, *L. maritimus* et *L. gemellatus*.

7-2 Genitalia des mâles

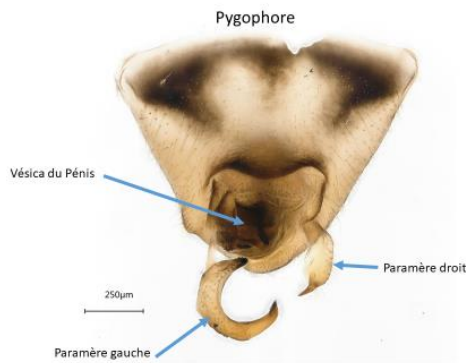


Figure 35 : pygophore mâle.

1. Les paramères (Figures 35, 36 et 37) sont illustrés par Wagner et Weber (1964). La planche montre que les paramères gauches (Figure 36) sont très semblables entre les espèces et en définitive non utilisables pour l'identification.

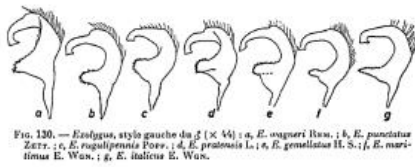
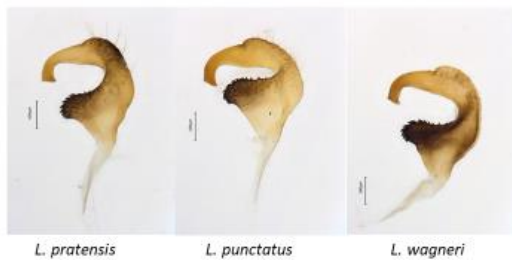


FIG. 130. — *Elygus*, style gauche du ♂ (× 44) : a, *E. wagneri* Hsu. ; b, *E. punctatus* Zett. ; c, *E. rugulipennis* Fov. ; d, *E. pratensis* L. ; e, *E. gemellatus* H. S. ; f, *E. maritimus* E. Wos. ; g, *E. italicus* E. Wos.



L. gemellatus *L. maritimus*

Figure 36 : illustrations de quelques paramères gauches pour une comparaison avec la clé existante en haut à gauche de Wagner et Weber (1964).

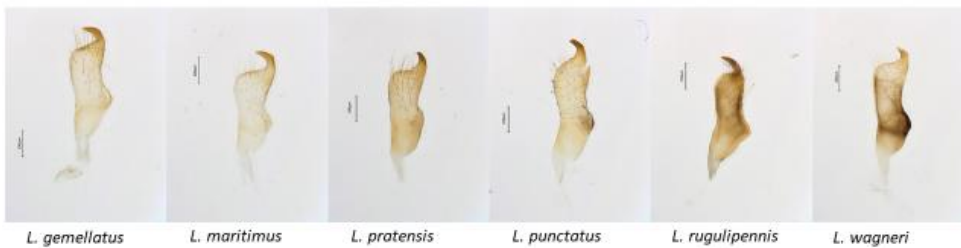


L. pratensis *L. punctatus* *L. wagneri*



L. rugulipennis

2. Les paramères droits (Figure 37) sont de la même façon très semblables d'une espèce à l'autre et n'apportent pas d'élément diagnostique.



L. gemellatus *L. maritimus* *L. pratensis* *L. punctatus* *L. rugulipennis* *L. wagneri*

Figure 37 : illustration de paramères droits sur 6 espèces françaises.

Concernant les deux paramères (Figure 35), plusieurs auteurs ont déjà constaté qu'ils n'étaient d'aucune utilité pour différencier les espèces européennes (Cobben, 1958 ; Schwartz et Footitt, 1998 ; Aglyamzyanov, 2006). Leston (1952) doute de plusieurs espèces européennes notamment parce que leurs paramères sont identiques. Ils sont par contre très homogènes et caractérisent bien le genre *Lygus* au sens restreint que j'ai adopté (voir paragraphe 6).

3. Le pénis (Figure 38) comprend deux lobes munis d'éléments qui ont des formes complexes difficiles à utiliser pour séparer les espèces entre elles. En revanche, le spicule qui est présent chez toutes les espèces et grandement variable a été abondamment utilisé soit dans les clés, soit en complément des clés par tous les auteurs que nous avons consultés. Wagner (1952) utilise la taille du spicule pour séparer

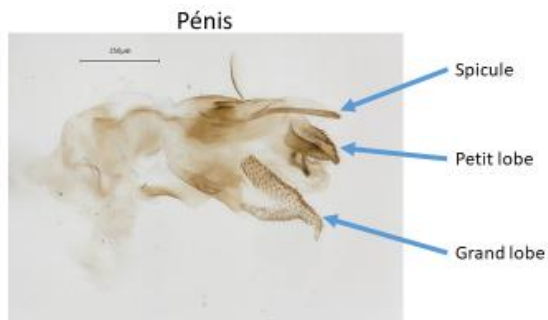


Figure 38 : Illustration d'un pénis et des différents éléments utilisés en taxinomie des Lygus.

L. gemellatus de *L. pratensis*. Pour une fois la différence semble être suffisamment importante pour pouvoir envisager son utilisation. Bien que la taille, la forme et la présence ou non de spinules à l'apex du spicule paraissent avoir un intérêt pour séparer les espèces (Figure 39), Cobben (1958) puis Aglyamzyanov (2006) signalent une certaine variabilité intra-spécifique notamment chez *L. maritimus*.



Figure 39 : Différence de longueur et variabilité des spicules en fonction des individus et en fonction des différentes espèces de Lygus.

7-3 Genitalia des femelles

Slater (1950) dit que la paroi postérieure du vagin fournit peu de caractères intéressants pour

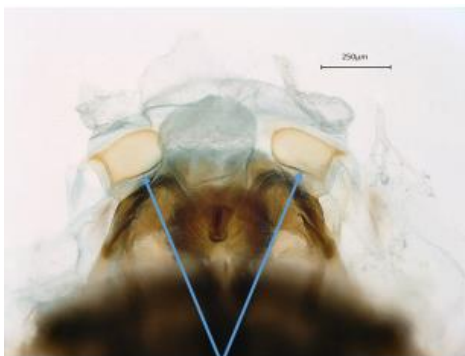


Figure 40 : Illustration de genitalia femelles.

séparer les espèces mais que les anneaux sclérifiés sont plus informatifs (Figure 40). Les genitalia femelles sont illustrés en partie par Cobben (1958), Vinokurov et Kanyukova (1995), Schwartz et Foottit (1998) puis par Aglyamzyanov (2006). La forme des anneaux sclérifiés est jugée intéressante par Aglyamzyanov (Figure 50). Stewart (1969) fournit l'illustration des genitalia femelles de plusieurs individus des espèces *L. punctatus*, *L. rugulipennis* et *L. wagneri*. Son travail met en évidence une importante variabilité intra-

spécifique qui limite leur utilisation comme outils d'identification. Schwartz et Foottit (1998) observent la même variabilité dans leurs études. J'ai disséqué quelques femelles mais les différences que j'ai observées sur les anneaux sclérifiés se sont révélées bien plus ténues que ne le laissait supposer les dessins d'Aglyamzyanov (2006) (Figure 41) et par conséquent, je n'ai pas poursuivi l'étude de ce caractère.

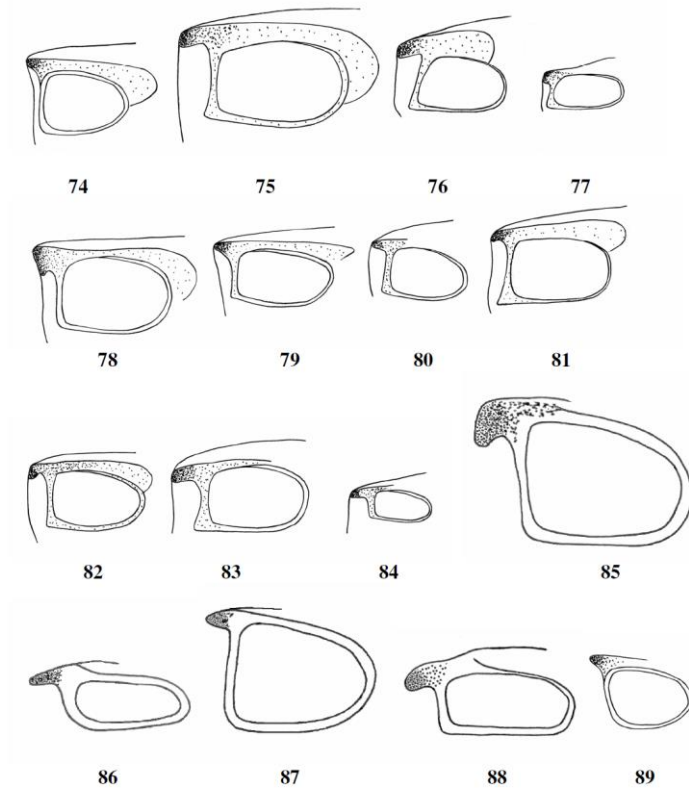


Figure 41 : Illustration des anneaux sclérifiés faite par Aglyamzyanov (2006) pour les espèces : 74, *L. pratensis*, 75, *L. pachynemis*, 76, *L. monticola*, 77, *L. orientis*, 78, *L. sibiricus*, 79, *L. rugulipennis*, 80, *L. izyaslavi*, 81, *L. wagneri*, 82, *L. gemellatus*, 83, *L. punctatus*, 84, *L. poluensis*, 85, *L. discrepans*, 86, *L. italicus*, 87, *L. maritimus*, 88, *L. martensi*, 89, *L. israelensis*.

7-4 Données morphométriques

Wagner et Weber (1964) donnent des mesures et rapports pour un certain nombre de caractères dans les diagnoses des espèces mais ne les utilisent pas dans la clé qu'ils proposent. Comme dans toutes les publications de Wagner, on ignore combien de spécimens ont été mesurés. Schwartz et Foottit (1998), dans le but de rechercher des relations phylogénétiques entre espèces, ont réalisé un grand nombre de mesures sur 20 mâles et 20 femelles de chaque espèce. Les mesures et ratios utiles sont inclus dans la clé des espèces américaines mais ils n'en utilisent aucun dans la clé des espèces paléarctiques (mis à part ceux repris de Wagner et Weber, 1964). Schwartz et Foottit (1998) mesurent la longueur totale du corps de la pointe du tylus à l'extrémité de l'abdomen alors que les autres auteurs, Wagner notamment, prolongent jusqu'au bout des ailes. Je n'ai donc pas pu comparer les mesures entre ces différents auteurs.

7-5 Conclusion sur la revue bibliographique des caractères morphologique

On peut constater que les clés existantes sont nombreuses mais reprennent toujours les mêmes critères pour identifier les espèces c'est-à-dire la couleur, la ponctuation et la longueur des poils, les pièces génitales mâles et plus rarement femelles.

Les différences morphologiques entre les espèces peuvent être insaisissables, subjectives, difficiles à décrire et ne s'appliquent qu'à certaines étapes du cycle de vie ou à un seul sexe. Certains caractères sont modifiés par les conditions environnementales et la plupart des critères utilisés pour l'identification, y compris ceux du pénis, sont sujet à une variabilité intra-spécifique importante, ce qui augmente les incertitudes d'identification (Piemontese et al., 2020). Pour mes identifications, je me suis principalement basée sur un ensemble de caractères : la ponctuation des hémélytres, la longueur et la densité de la pilosité, l'eunomie du scutellum, la coloration générale, la coloration de la partie apicale de l'article antennaire II, la tache noire sur le tylus et sur les spicules du pénis.

8. Identification moléculaire des espèces du genre *Lygus*

Les séquences d'ADN peuvent être un outil utile pour délimiter les espèces (Voir chapitre I-B-2-2), ainsi que pour donner un aperçu des relations phylogénétiques (Kim et Jung, 2018). Jusqu'à présent, l'analyse des séquences dans le genre *Lygus* a été quelque peu fragmentaire, et a concerné essentiellement les USA (Burange et al., 2012 ; Hull et al., 2013 ; Rhordanz et al., 2015) et la Chine (Zhang et al., 2017). Aux USA, les espèces de *Lygus* les plus étudiées d'un point de vue moléculaire sont *L. hesperus* et *L. lineolaris* (voir Tableau 8 : récapitulatif des séquences disponibles dans les bases de données existantes NCBI et BOLD).

Par ailleurs, peu d'études moléculaires ont été faites dans une optique taxonomique. Celles-ci traitent plutôt de la dynamique des populations et surtout de la structuration de l'espèce étudiée. Deux études ont examiné la diversité intra-spécifique en utilisant des séquences d'ADN mitochondrial (ADNmt). Burange et al. (2012) ont examiné la diversité d'un segment COI-CO2 chez *L. lineolaris* de l'est de l'Amérique du Nord. Un examen similaire de la diversité de COI chez *L. hesperus* de l'ouest de l'Amérique du Nord a également été publié par Zhou et al., (2012). Cette étude montre que malgré une importante variabilité de couleurs et d'habitats, aucune structure génétique n'a été mise en évidence parmi les populations de cette punaise. Une seule étude sur les Miridae incluant des *Lygus* européens est celle de Raupach et al. (2014). Mais cette étude ne s'intéresse qu'à 10 spécimens appartenant à 3 espèces différentes (*L. gemellatus* (2), *L. pratensis* (7) et *L. wagneri* (1)) et les séquences obtenues ne permettent pas de différencier ces trois espèces. Il n'existe finalement que très peu d'articles s'intéressant à l'identification des espèces et à l'évolution du genre *Lygus*. De plus, à l'heure actuelle, il est difficile de trouver, dans les bases de données moléculaires et dans la littérature des séquences pour les espèces européennes. Les données sur les espèces américaines dominent (Tableau 8), mais au final, il n'existe pas de gènes qui permettent de différencier de façon fiable les espèces américaines. Par contre, il existe 4 génomes mitochondriaux complets sur lesquels, il est possible de s'appuyer pour faire des études moléculaires plus poussées notamment en terme de gènes étudiés (Wang et al., 2017). Deux de

ces 4 génomes sont des espèces américaines (*L. hesperus* et *L. lineolaris*) et les autres sont ceux des deux espèces les plus couramment trouvées dans les régions paléarctiques (*L. pratensis* et *L. rugulipennis*).

Tableau 8 : Résumé de l'ensemble des séquences disponibles dans les bases de données existantes NCBI et BOLD, tous gènes confondus.

	Espèces	NCBI	BOLD
Espèces présentes en France	<i>Lygus gemellatus</i>	8	23
	<i>Lygus italicus</i>	0	0
	<i>Lygus maritimus</i>	0	5
	<i>Lygus pratensis</i>	278	90
	<i>Lygus punctatus</i>	9	12
	<i>Lygus wagneri</i>	2	9
	<i>Lygus rugulipennis</i>	55	67
Espèces américaines	toutes espèces de <i>Lygus</i> confondues	90706	2789

9. Rappel des objectifs de l'étude : pourquoi et comment revoir la discrimination des espèces de *Lygus* d'Europe de l'Ouest?

L'analyse bibliographique précédente tend à montrer que la taxinomie morphologique du genre *Lygus* est fixée depuis plusieurs années. En effet, tous les auteurs utilisent les mêmes critères depuis les années cinquante et ont tendance à penser qu'ils sont fiables. Plusieurs éléments doivent toutefois nous alerter sur de potentielles difficultés dans la caractérisation des espèces de *Lygus* européens :

- une grande partie des clés émane d'un seul auteur - E. Wagner (Wagner, 1952 ; Stichel, 1956 ; Wagner et Weber, 1964 ; Wagner, 1971) et les travaux ultérieurs y compris américains et chinois (Schwartz et Footit, 1998 ; Zheng et al., 2004) ont largement repris les bases établies par cet auteur.
- Plusieurs auteurs mettent en garde sur la pertinence des critères qu'ils adoptent et notamment leur variabilité intra-spécifique (Southwood et Leston, 1959 ; Schwartz et Footit, 1998 ; Aglyamzyanov, 2006 etc.).
- On constate des contradictions entre auteurs sur certains caractères (Southwood et Leston, 1959) et (Wagner et Weber, 1964).
- Les transferts répétés de sous-espèces d'une espèce à une autre et des synonymies récentes (Linnavuori, 1960 ; Wagner, 1974 ; Aglyamzyanov, 2006 ; Demchenko, 2004 etc.).
- Certaines données biologiques ou biogéographiques difficilement explicables, notamment l'absence de *L. gemellatus* en Angleterre ou la distribution de *L. maritimus* et sa faculté à coloniser l'intérieur des terres sur cette île (Southwood et Leston, 1959).
- Certains traits biologiques comme le fait que les générations estivales et automnales soient morphologiquement différentes, que la température influe sur la morphologie, que le dimorphisme sexuel soit noté sans être pris en compte dans les clés de détermination.

- Le fait que les rares études de biologie moléculaire publiées ne soient pas concluantes concernant la discrimination des espèces avec les gènes habituels (Raupach et al., 2014 ; Piemontese et al., 2020).

- Les séquençages de *Lygus* européens et américains que nous avons réalisés en amont de mon mémoire pour le projet européen Qbol ont montré que le gène COI n'était vraisemblablement pas suffisant pour discriminer les espèces.

En plus de ces signaux, tous les spécialistes actuels des Miridae sont unanimes pour dire qu'il existe d'énormes difficultés pour identifier les spécimens et que la caractérisation de ces espèces est compliquée. Nous avons, nous-mêmes (J.-C. Streito et moi-même), rencontré des difficultés. L'examen des deux collections consultées au cours de mes travaux (celles du CBGP et celle de Jean-Claude Streito) illustrent bien que l'identification des *Lygus* demeure très problématique. Si on prend la collection de J.-C. Streito (Figure 42), on constate que dans la boîte consacrée aux *Lygus*, de nombreux spécimens



portent deux voire trois étiquettes d'identifications contradictoires (Figure 42)! La collection du CBGP et tout aussi inutilisable pour les mêmes raisons pour confirmer une identification.

Figure 42 : Exemple d'échantillons comportant plusieurs identifications différentes effectuées par des taxonomistes différents (collection J.-C. Streito).

Ainsi les identifications avec les outils existants sont peu crédibles. Non seulement, il subsiste de gros doutes sur la fiabilité des critères morphologiques habituels mais aussi sur l'aptitude du COI à différencier les espèces. Compte tenu de l'importance agronomique du genre *Lygus*, il est donc nécessaire d'utiliser une batterie de techniques pertinentes dans le cadre du concept de taxinomie intégrative afin de résoudre le problème de l'identification des espèces. Par conséquent, au cours de mon étude, je vais tester dans un premier temps la validité des caractères morphologiques établis depuis 150 ans (identifications répétées à l'aveugle par A. Matocq, J. Fandos, E. Pierre, J.-C. Streito et moi-même). Puis un deuxième volet concernera l'utilisation de plusieurs méthodes pour tenter d'obtenir au final des identifications et des outils clairs et fiables. Chaque technique utilisée est différente et indépendante :

-l'identification morphologique,

-le barcoding (fonctionne en général pour les punaises : 80% des espèces peuvent être caractérisées ainsi),

-l'utilisation d'autres gènes si le COI n'est pas assez performant au niveau de la caractérisation,

-la morphométrie avec l'étude des points homologues (landmarks) et morphométrie géométrique avec l'étude des contours,

- la recherche de différences moléculaires à l'aide de la technique RADseq si l'ensemble des autres méthodes ne fonctionne pas pour trouver des marqueurs fiables.

B/ Matériel et méthodes

1. Matériel étudié

Le tableau complet des échantillons que j'ai étudiés pour les différents taxons de *Lygus* est disponible en tableau 1 annexe 2. Le tableau 9 résume le nombre d'individus analysés par espèce et par technique : dissection, morphométrie (point et contour) et nombre de séquences obtenues par séquençage Sanger et haut-débit (COI et autres gènes) et RADSeq.

Tableau 9 : Résumé du nombre d'échantillons par espèce étudiés pour chaque technique.

	nb mâles	photo	dissection	identification aveugle	morphométrie points	morphométrie contour	CO1	Cytb	ND5	28S	ITS	RAD
<i>L. gemellatus</i>	22	8	5	5	5	6	11	10	10	11	11	3
<i>L. italicus</i>	7	3	5	1	3	3	6	6	6	6	6	5
<i>L. maritimus</i>	9	5	6	2	5	5	8	8	8	6	8	4
<i>L. pratensis</i>	54	16	8	5	11	15	22	11	10	10	11	4
<i>L. punctatus</i>	17	8	10	6	7	8	12	5	6	5	6	4
<i>L. wagneri</i>	6	4	5	3	1	4	5	5	5	4	5	4
<i>L. rugulipennis</i>	28	17	23	2	10	18	19	17	17	16	17	4
<i>L. bradleyi</i>	2	1	1				2	2	2	2	2	1
<i>L. lineolaris</i>	9	2	8				9	3	4	2	4	1
<i>L. elisus</i>	3						3	2	1	1	3	
<i>L. vanduzeei</i>	4	3	2				4	4	4	2	2	1

J'ai eu accès à l'ensemble des espèces présentes en France et en Europe de l'Ouest. Toutefois, malgré de nombreuses missions, recherches et demandes pour obtenir des spécimens de *L. italicus* et de *L. wagneri*, ces deux espèces sont en sous-effectifs. En effet, ce sont deux espèces relativement rares et localisées en France, la première n'est quasiment citée que de Corse et la seconde localisée en altitude (> à 1000 m). Pour *L. maritimus*, je n'ai que peu de localités (en Bretagne et en Occitanie).

Malgré ces inconvénients, mon échantillonnage reflète les espèces les plus courantes dans les cultures c'est-à-dire *L. gemellatus*, *L. rugulipennis*, *L. pratensis* pour lesquelles j'ai des effectifs importants répartis entre plusieurs localités d'échantillonnage dans toute la France.

Pour chaque espèce, j'ai essayé au maximum que les échantillons sélectionnés servent à toutes mes études morphométriques et moléculaires pour me permettre de confirmer ou d'infirmer l'identification faite au préalable et d'avoir le maximum de données sur le même spécimen. Je n'ai étudié que les mâles de manière à pouvoir observer le spicule du pénis pour tous les spécimens. L'extraction d'ADN a eu lieu avant ou après la dissection, l'ordre de ces deux opérations n'ayant aucune conséquence sur leur qualité. La prise d'image en vue des analyses morphométriques a été réalisée systématiquement sur des spécimens ayant été extraits de manière à éviter des biais liés à la digestion. Je n'ai pas réalisé les photographies avant digestion de manière à pouvoir exploiter en morphométrie les échantillons des espèces américaines qui avaient été déjà séquencés au cours de travaux antérieurs (notamment Qbol).

Malgré le nombre important d'échantillons disponible au départ, je n'ai pas toujours pu obtenir toutes les informations que je désirais pour un nombre optimal de spécimens. Tout d'abord je n'ai étudié que les mâles, ce qui diminue beaucoup le nombre de spécimens disponibles. La dissection du spicule est

une opération délicate et j'ai parfois déchiré le pénis et cassé le spicule, rendant ainsi le spécimen inexploitable pour l'identification et les études ultérieures. De même, chez certains individus dont la mue imaginale est récente, le spicule est mal sclérifié et on le distingue très mal. Il est également arrivé que je ne puisse pas utiliser les photos pour la morphométrie car l'extraction d'ADN avait déformé le spécimen, le rendant complètement inexploitable (Figure 43). Enfin l'amplification des différents marqueurs ne fonctionne jamais à 100% ce qui a pu réduire encore un peu le nombre de spécimens pour lesquels toute l'information est disponible.



Figure 43 : Exemples de photographies inexploitable pour la morphométrie.

Ceci étant, et dans la mesure du possible, les différentes techniques seront appliquées sur un même échantillon pour obtenir une caractérisation fiable et juste de manière à pouvoir avoir des bases fiables de travail pour la recherche d'outils d'identification précis et répétables.

2. Identification morphologique des échantillons et vérification de la pertinence des caractères morphologiques utilisés pour identifier les *Lygus* d'Europe de l'Ouest.

Chaque insecte est identifié selon la clé d'identification de la Faune de France (Wagner et Weber, 1964) selon les caractères morphologiques 1 à 8 présentés précédemment. Vu les difficultés rencontrées et les expériences des taxonomistes du laboratoire, j'ai systématiquement associé l'examen du spicule du pénis à la clé de détermination de manière à accroître la fiabilité de l'identification. Comme expliqué plus haut, je n'ai pas procédé à l'examen ni des paramères, ni des genitalia femelles jugés trop peu discriminants.

Pour la détermination taxonomique et les études morphologiques, le pénis avec le spicule est mis ainsi en évidence selon la méthode décrite dans le chapitre 2-2 du Matériel et Méthodes généraux.

Quelques pénis et paramères sont photographiés, puis le spicule est détaché du pénis pour le photographier seul. J'ai également tenté de le mesurer mais le point de départ de la mesure du spicule est difficile à déterminer et j'ai abandonné cette mesure après ces essais préliminaires, le taux d'erreur de la mesure étant trop important. Une fois l'ensemble photographié et mesuré, le pénis et les paramères sont mis dans des tubes de pièces génitales et mis en collection avec le numéro ID de l'échantillon correspondant (voir annexe 2).

Pertinence des caractères d'identification

Pour vérifier la pertinence des caractères pris en compte pour la caractérisation morphologique et les identifications des espèces, une série de 22 numéros ID a été sélectionnée au hasard pour servir à

un test d'identification à l'aveugle de ces échantillons de *Lygus* que j'avais préalablement identifiés et classés sur la base d'une phylogénie du gène COI. Cette procédure a permis de se mettre dans les meilleures conditions possibles (des échantillons caractéristiques dont le COI est cohérent avec l'identification morphologique) pour évaluer la fiabilité des caractères utilisés globalement depuis 1964 pour les identifications des *Lygus*. J'ai demandé à Armand Matocq, Jean-Claude Streito (3 fois à l'aveugle), Éric Pierre et Jérémie Fandos (2 fois à l'aveugle) de se prêter au jeu de cette reconnaissance à l'aveugle. Outre Armand Matocq, spécialiste reconnu des Miridés et Jean-Claude Streito, entomologiste spécialiste des punaises, Éric Pierre est un entomologiste spécialiste des diptères au CBGP et Jérémie Fandos est un stagiaire ingénieur étudiant à Supagro Montpellier. Cette identification est très consommatrice de temps et malheureusement, A. Matocq n'a pas pu identifier autant de matériel que prévu ne restant au CBGP qu'une journée et les identifications non effectuées faute de temps sont indiquées en noir, dans le tableau 1 situé en annexe 7.

Pour cette identification à l'aveugle, j'ai utilisé la norme OEPP PM 7/98 (3) de 2018 émise par l'Organisation Européenne et Méditerranéenne pour la Protection des Plantes. J'ai ainsi pu tester deux des trois critères nécessaires pour obtenir un bon diagnostic selon cette norme : la répétabilité ou fiabilité et la reproductibilité. La robustesse n'a pas pu être testée car un autre laboratoire et d'autres personnes auraient dû être mis à contribution pour identifier également les mêmes échantillons à l'aveugle. La répétabilité a été calculée sur deux personnes, J.C. Streito et J. Fandos qui ont respectivement identifié trois et deux fois les échantillons à des moments différents. Le pourcentage de « réussite » a été obtenu en comparant leurs résultats à mes identifications (considérées comme correctes). La reproductibilité a été calculée sur le résultat obtenu avec les quatre personnes se prêtant à l'analyse. Le pourcentage de réussite a également été calculé par comparaison avec mes identifications. Ces deux critères ont été testés sur les espèces seules et des regroupements effectués sur la base des spicules observés (spicule fin et lisse *L. gemellatus/L. maritimus/L. italicus* ; spicule long avec une forme de spatule à l'apex *L. pratensis/L. punctatus/L. wagneri* ; spicule court avec des spinules à l'apex *L. rugulipennis*).

3- Recherche de marqueurs moléculaires

3-1 Avec différents fragments de gènes

Comme énoncé dans le chapitre B-4 (« Matériels et méthodes généraux ») une première étude sur un fragment du gène COI (658pb) a été effectuée sur 83 échantillons déjà identifiés et stockés dans les collections du laboratoire. Un arbre phylogénétique préalable a été reconstruit avec la méthode Neighbour Joining avec le modèle d'évolution « Kimura 2 paramètres » avec 1000 répliques de bootstrap. Cet arbre préliminaire a permis de mettre en évidence un manque de résolution et donc la nécessité d'utiliser d'autres gènes pour pouvoir caractériser efficacement le genre *Lygus*.

Les différents gènes ont été sélectionnés en fonction de la bibliographie et après avoir fait un test sur 16 échantillons (Tableau 2 Annexe 2) dont un outgroup *Adelphocoris* (Famille des Miridae) ; celui-ci est

le plus éloigné des groupes externes que l'on prendra pour nos analyses ultérieures et a été choisi comme tel pour être sûr d'avoir des arbres phylogénétiques enracinés et exploitables. Cette liste d'échantillons a été établie en fonction de l'arbre préliminaire, et l'outgroup choisi en fonction d'un arbre établi sur différents genres de Miridae disponibles au laboratoire.

J'ai ainsi testé deux gènes mitochondriaux supplémentaires : Cytb et ND5, et deux gènes nucléaires : les ITS et le 28S (énumérés dans le chapitre 4-2 du Matériels et Méthodes Généraux).

L'ensemble de mes échantillons a donc été amplifié pour les 5 gènes (COI, Cytb, ND5, 28S et ITS) selon les conditions données par le tableau 3 du chapitre 4-2 du « Matériels et Méthode Généraux ». Les amplifications positives ont été envoyées à MWG Eurofins Genomics pour séquençage par la méthode Sanger selon les protocoles de ce prestataire de service. Les séquences produites ont ensuite été nettoyées et les arbres phylogénétiques reconstruits comme énoncé dans le chapitre 4-3 du « Matériel et Méthode généraux ».

Le tableau résumant les modèles d'évolution pour chaque alignement de séquences est donné en annexe 8. Les séquences ont été concaténées à l'aide du logiciel GENEIOUS de trois façons : une regroupant toutes les séquences issues des gènes mitochondriaux (1836 pb), une regroupant les gènes nucléaires (1768 pb) et ensuite, une concaténation regroupant l'ensemble des séquences issues du COI, du Cytb, du ND5, du 28SD2 et des ITS (3604 pb).

3-2 Réseaux d'haplotype sur les séquences obtenues

La reconstruction d'une phylogénie à partir de l'ensemble des données s'est avérée difficile à interpréter en raison d'artéfacts (séquences isolées) et de petites distances génétiques. Nous avons donc choisi la reconstruction d'un réseau d'haplotypes à partir de toutes les données afin de mieux visualiser les délimitations entre taxons et individus. Cette méthode vise habituellement à analyser des données de génétiques de populations pour visualiser les relations généalogiques au niveau intra-spécifique, ainsi que pour faire des inférences phylogéographiques comme chez *L. pratensis* en Chine (Zang et al., 2017) mais elle a également été utilisée pour étudier des ensembles de données interspécifiques (Fulton et al., 2012; Yamakawa et Imai, 2013).

Ainsi, pour tous les gènes et les concaténations, j'ai utilisé le logiciel PopArt (Population Analysis with Reticulate Trees) version 1.7 avec la méthode MJN (*Median Joining Network* avec paramètre par défaut : epsilon = 0) sur les différents alignements de séquences obtenus précédemment. Ce logiciel permet de représenter les liens entre les génotypes individuels au niveau des populations, il contient des outils de visualisation phylogéographique et des tests statistiques standards à partir des données de séquences comme données d'entrée.

Les réseaux haplotypes fournissent une représentation concise et accessible des données elles-mêmes, un aspect qui est souvent perdu dans les méthodes fortement dépendantes de l'inférence basée sur des modèles. Une limitation importante concernant les méthodes de réseaux est qu'elles n'impliquent pas explicitement des modèles évolutifs lors de la construction des réseaux c'est-à-dire qu'il n'y a pas de

prise en compte de l'homoplasie. Dans tous les cas, sauf les plus simples, il serait imprudent d'interpréter les réseaux comme des reconstructions de l'histoire de l'évolution, du moins pas sans preuves corroborantes.

3-3 Etude de RADseq

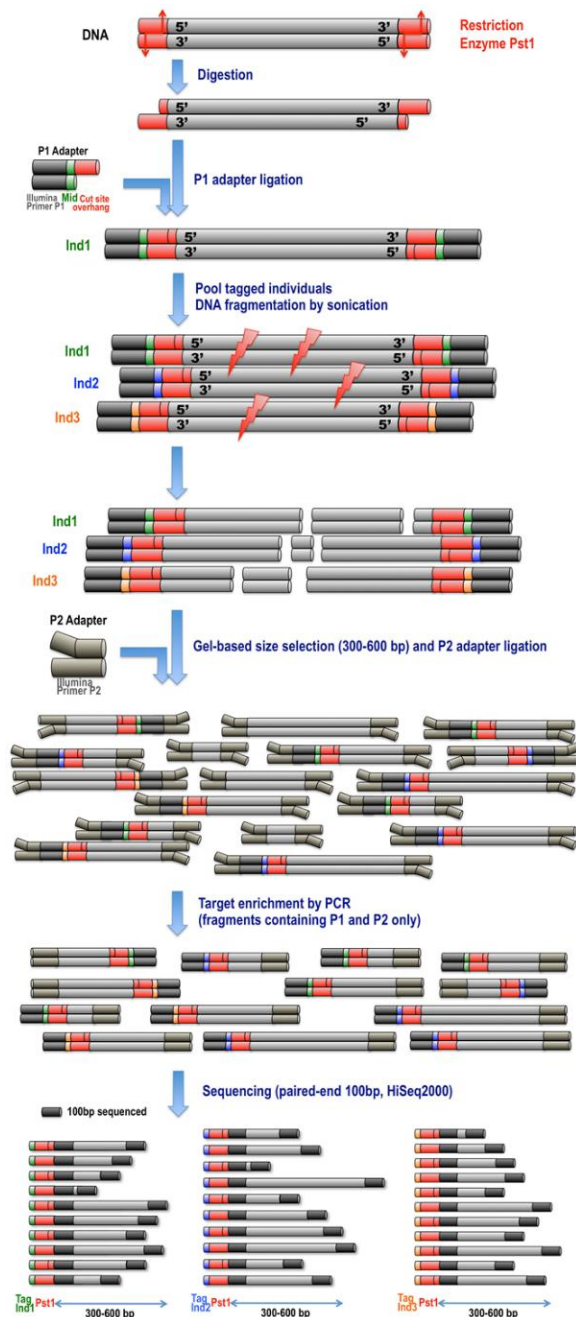


Figure 44 : Schéma des étapes de la préparation de la librairie RADSeq.

Le COI ainsi que les autres gènes n'ayant pas apporté des réponses suffisamment claires, j'ai souhaité voir s'il existait dans le génome des *Lygus* des marqueurs moléculaires plus pertinents pour répondre à la question de caractérisation des espèces. J'ai ainsi utilisé la méthode RADseq (Restriction-site Associated DNA sequencing) qui est un séquençage NGS (Nouvelle Génération de Séquençage) du génome entier pour la détection, sans *a priori*, de variations de type SNPs (*Single Nucleotide Polymorphism*) et indels (insertions – délétions) de l'ADN. Cette méthode consiste en un séquençage ciblé des régions adjacentes à des sites de restriction communs répartis sur tout le génome. L'utilisation d'un génome de référence n'est pas nécessaire.

Un « run » RADseq a été réalisé sur 32 échantillons sélectionnés après avoir passé toutes les étapes d'analyses morphologiques, moléculaires et morphométriques. Il m'était difficile de faire cette étude sur l'ensemble des échantillons traités. En effet, pour cette étude, il faut une grande quantité d'ADN de départ ainsi qu'une très bonne qualité et suite à l'ensemble des études effectuées sur les différents gènes, la quantité d'ADN était pour certains échantillons trop faible et donc impossible à intégrer dans cette analyse. Il m'a d'ailleurs fallu extraire d'autres échantillons de *L. gemellatus* pour cette étude.

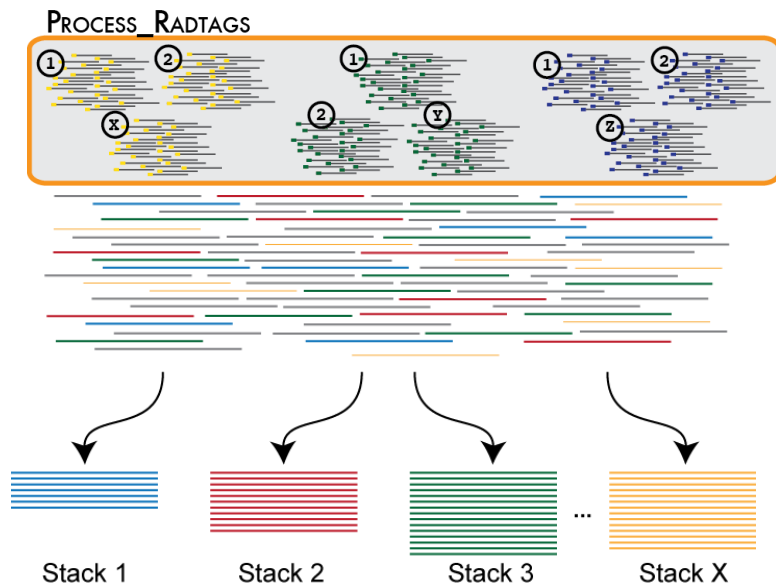


Figure 45 : Schéma d'un démultiplexage issu du tutoriel de Stacks.

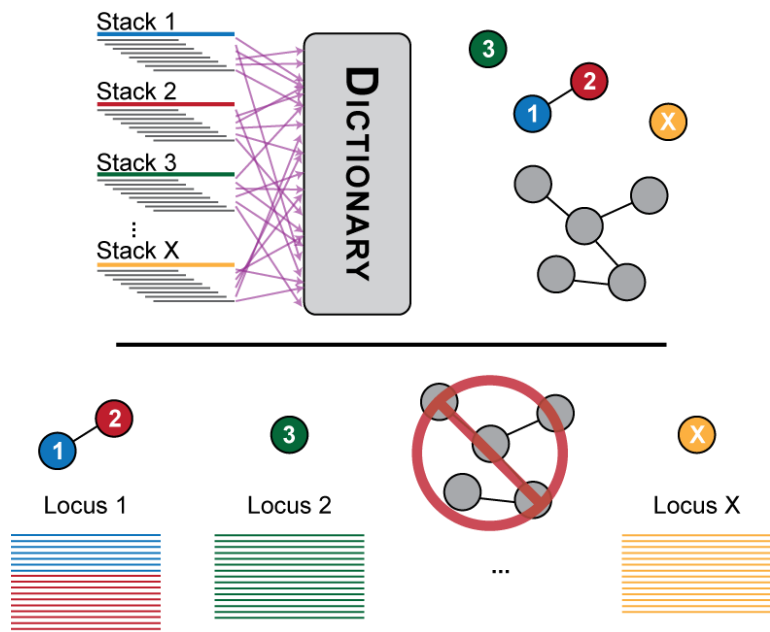


Figure 46 : Schéma de construction de liste de loci disponibles et des liens qui existent entre ces loci (extrait du tutoriel de Stacks).

La méthode RADseq (Figure 44) commence par un dosage des extractions d'ADN, et une normalisation de manière à obtenir la même quantité pour chaque échantillon. Puis, les ADN sont digérés avec l'enzyme PstI (5'CTGCA-G 3'). Une fois la digestion terminée, un adaptateur (P1) est ligué. Les adaptateurs utilisés sont listés dans le tableau 2 en annexe 8. Chaque individu aura donc son tag unique et sera ainsi reconnu grâce à celui-ci.

Une fois la ligation terminée, une sonication est effectuée. La sonication consiste à appliquer une énergie sonore pour agiter les particules d'un échantillon, ce qui permet de couper les ADN aléatoirement. Après cette étape de coupure aléatoire, une sélection des fragments entre 300 et 600 pb est faite à partir d'une migration sur gel « low melting ». Une purification est effectuée et la réparation en 3' et l'ajout d'une adénine en 3' permettent ensuite la ligation de

l'adaptateur P2. Un enrichissement par amplification des fragments obtenus permet ensuite d'augmenter la quantité de fragments à séquencer. Une fois enrichie, la librairie est quantifiée à l'aide du Qubit Fluorometer (ThermoFisher Scientific) et d'une puce de Bioanalyseur Agilent 2100 (Agilent) et donnée à séquencer à la plateforme MGX de Montpellier sur un appareil NOVASEq 6000. Les étapes de la préparation d'une librairie RADseq sont résumées sur la figure 44.

Une fois le séquençage terminé, les données brutes sont stockées sur le serveur d'INRAe Genotoul et analysées à l'aide du pipeline RADIS (Cruaud et al, 2016) qui repose sur Stacks (Catchen et al, 2011, 2013) pour les grandes étapes de l'analyse : le démultiplexage des données, l'élimination des dupliques

d'amplification et la construction de loci individuels ou d'un catalogue de loci pour chaque échantillon analysé (Figure 45 et 46).

La première étape de cette analyse de séquences consiste à sauvegarder les données brutes et à vérifier si lors du téléchargement de ces données, l'intégrité des données a été conservée. Une fois que ces données sont accessibles, une étape de filtrage des données est effectuée. Les séquences de mauvaise qualité sont éliminées ainsi que celles qui ne contiennent pas le site de restriction. La recherche du nombre de PCR dupliquées (issues de la PCR d'enrichissement) est effectuée et les séquences en découlant sont également éliminées et mises dans un fichier « clone_filter ». Ensuite, une recherche des adaptateurs P1 et P2 est faite ce qui permet d'attribuer directement les séquences à l'échantillon étudié, les fichiers de séquences sont donc renommés avec le numéro ID de l'individu (= démultiplexage) (Figure 45) et on obtient ensuite le nombre de lectures prêtes (Read1 [équivalent de forward] et Read2 [équivalent de Reverse]) pour les analyses de données. Une fois que ces données sont prêtes, on construit un nombre de loci pour chaque individu ainsi qu'une liste (catalogue) d'allèles disponibles pour faire des analyses de génétique de populations ou phylogénétique (Figure 46).

Chaque paramètre du pipeline utilisant Stacks est fixé par l'utilisateur : i) j'ai fixé à 2 (le minimum) le nombre maximum de nucléotides de différence entre les groupes (M : groupe constitué par l'assemblage des lectures qui matchent exactement ou avec peu de différences) ; ii) j'ai fixé à 10 le nombre de différences entre les loci individuels (n) ; enfin j'ai fixé à 100, le nombre de loci pour un échantillon à garder dans l'analyse (L). Ainsi, après plusieurs essais, j'ai appliqué les paramètres suivants appelés stacks_M2n10S8L100, M=2 (ustacks), n=10 (cstacks), L=100. S=8 correspond au nombre d'échantillons pour lesquels les loci sont en commun. Seuls les échantillons qui ont 100 loci pour lesquels au moins 8 individus ont les séquences sélectionnées (S=8). Une fois ces paramètres déterminés, une analyse avec RAxML est effectuée pour obtenir un arbre phylogénétique en utilisant les paramètres suivant : GTRGAMMA et 100 répliques de Bootstrap. L'arbre reconstruit est visualisé à l'aide de Tregraph.

4- Essai d'identification morphométrique

Le principe est de mettre en évidence des différences de taille et de conformation dans le but d'identifier et de quantifier les différences morphologiques entre les taxons. Les fondements de chacune des analyses morphométriques (par points homologues et par contour) ont été abordés dans le chapitre 3 « Matériels et Méthodes Généraux ».

Chaque mâle du genre *Lygus* (ceux pour lesquels l'ADN a été extrait et séquencé) est photographié dorsalement quand cela a été possible. J'ai essayé d'avoir le maximum d'échantillons dans la mesure du possible (tableau 10).

Tableau 10 : Résumé du nombre d'échantillons étudiés par espèce pour chaque étude de morphométrie.

	nb mâles	photo	dissection	morphométrie points	morphométrie contour
<i>L. gemellatus</i>	22	8	5	5	6
<i>L. italicus</i>	7	3	5	3	3
<i>L. maritimus</i>	9	5	6	5	5
<i>L. pratensis</i>	54	16	8	11	15
<i>L. punctatus</i>	17	8	10	7	8
<i>L. wagneri</i>	6	4	5	1	4
<i>L. rugulipennis</i>	28	17	23	10	18

Le nombre indiqué pour la dissection correspond au nombre de spicules corrects. Tous les spécimens ont été disséqués mais en fonction de la dissection du spicule et du stade des adultes (mue imaginale récente), le nombre de spicules pouvant servir aux études s'est trouvé réduit. Sur chaque photo, une analyse utilisant des points homologues, ainsi qu'une analyse de morphométrie géométrique basée sur le contour du pronotum et sur celui du pronotum couplé avec les hémélytres a été pratiquée quand cela a été possible en fonction des éventuels dommages énumérés précédemment subis par l'échantillon. Le nombre de photos représente donc le nombre d'échantillons *a priori* corrects pour chaque espèce.

4-1-Etude des points homologues ou étude Procruste

Les points homologues sont placés pour avoir une bonne représentation de la forme (une bonne couverture). La reproductibilité de ces points est importante ainsi que leur nombre et ils doivent être choisis en fonction de la question biologique posée : Ici, la question est : existe-t-il une variation dans la morphologie générale des *Lygus* qui puisse permettre de caractériser les espèces les unes par rapport aux autres ?

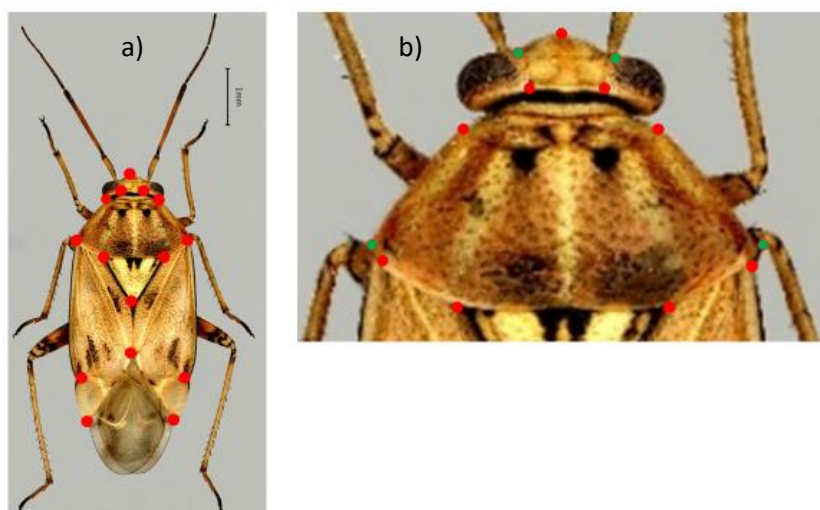


Figure 47 : a) Illustration de la position des différents points homologues pour l'étude procruste à gauche. b) Ajout en vert positions des 4 points rajoutés au niveau de la tête et du pronotum illustration de droite.

Chaque photo est orientée identiquement et est numérotée avec le numéro ID du *Lygus* et son identité spécifique. En fonction de la littérature et de la morphologie, nous avons déterminé 15 puis ensuite 19 points homologues. La figure 47a illustre le positionnement des 15 points et la figure 47b les 4 points supplémentaires ajoutés au niveau de la tête et du pronotum (en vert).

La suite de l'analyse par point homologue ou superposition Procruste se déroule en trois étapes comme expliqué dans le chapitre 3-2-1 du « Matériels et Méthodes Généraux ».

Un script sous R utilisant les packages Geomorph et Stereomorph (en annexe 5) a été écrit et utilisé pour faire les analyses sur les 42 photographies doublées soit 84 photographies de *Lygus* retenues et préparées sous Adobe Photoshop. Cette analyse a été répétée deux fois pour mesurer l'estimation de l'erreur de mesure.

4-2 Étude des contours à l'aide des transformées de Fourier

Cette méthode se pratique notamment quand on a des contours complexes, ce qui est le cas avec nos échantillons. Le principe général en a été présenté dans le chapitre 3-3-2 du « Matériels et Méthodes généraux ». Chaque coordonnée de points sera analysée comme une fonction périodique.

Ainsi chaque photo générale est décomposée en 2 parties : le pronotum seul et le pronotum avec les hémélytres. Le pronotum a fait l'objet d'une étude particulière par rapport à la littérature. En effet, selon Schwartz et Footitt, (1998), il existe des différences au niveau de l'angle antérieur du pronotum. Une fois sélectionnées, retravaillées, les photographies sont mises en noir et blanc (Figure 48) pour une



Figure 48 : Exemple de photo de pronotum mis en noir et blanc avant analyse des contours.

analyse de contours à l'aide des transformées de Fourier.

Au niveau du script la forme du contour est décomposée en ellipse (Figure 49). Chaque point de contour (Figure 49 : figure de gauche) est décomposé en paramètres x_1 et y_1 (courbe bleue) et x_2 et y_2 (courbe rouge). Ces deux courbes représentent les fonctions trigonométriques (le cosinus et le sinus) de l'angle de la forme originale. Ensuite, il faut calculer le nombre d'harmoniques

qui permet de représenter la forme du contour du pronotum sans trop d'erreur ni de déformation. Avec

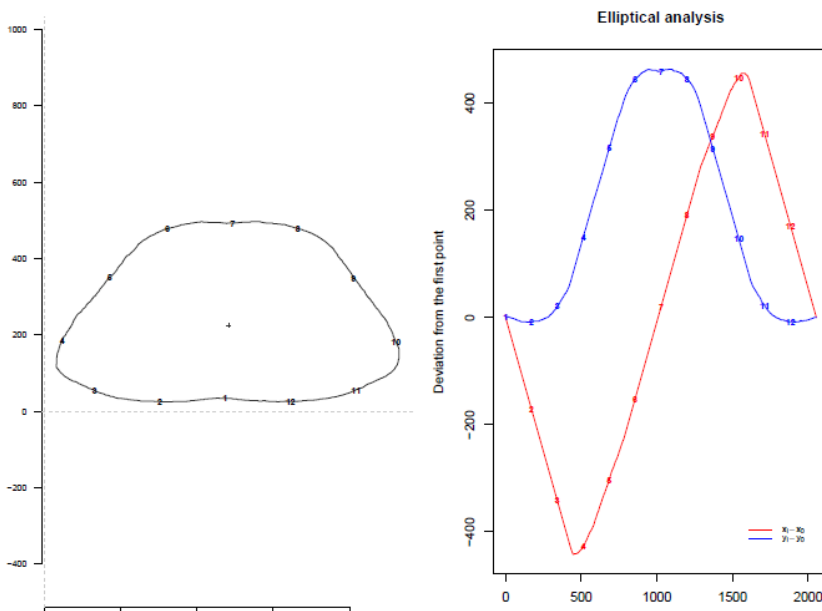


Figure 49 : Illustration d'une décomposition de la forme en ellipse.

la figure 50, on voit qu'il faut 6 harmoniques pour reconstituer 99,5 % de la forme. Il est important de ne pas utiliser trop d'harmoniques pour ne pas cumuler trop de paramètres à estimer.

Mon étude a été effectuée sur 59 photos. Chaque photo a été orientée de manière identique, le résultat de ce type d'étude étant souvent très dépendant de cette orientation.

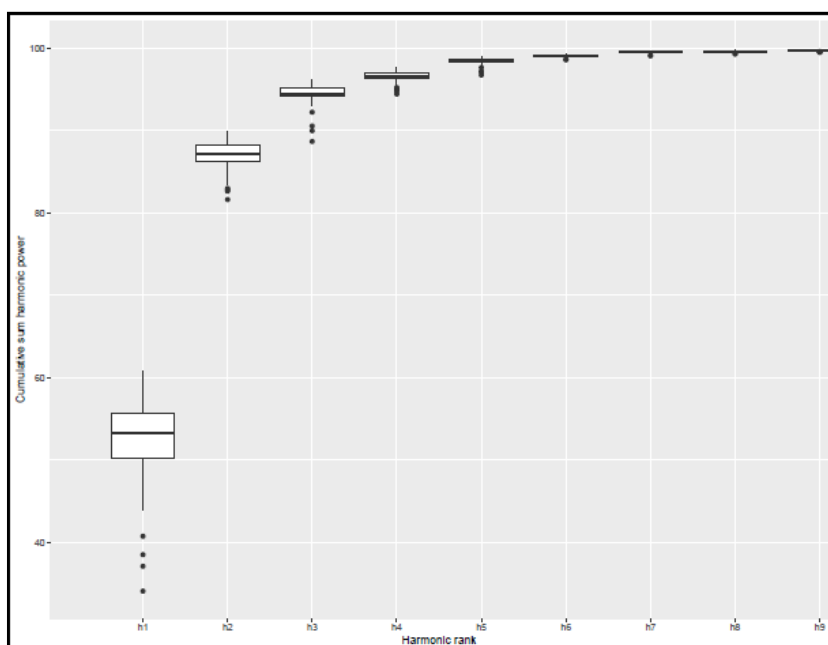


Figure 50 : Illustration du nombre d'harmoniques nécessaires pour reconstituer la forme.

Il faut prendre en compte l'erreur de mesure : plus le rang de l'harmonique augmente, plus sa longueur d'onde diminue et donc plus l'harmonique décrit une structure de détail (par exemple une irrégularité du contour qui n'a pas de sens biologique). Il faut donc estimer l'erreur pour chaque

harmonique par le coefficient de variation moyen de l'amplitude.

J'ai fait toutes mes analyses avec 10 harmoniques pour homogénéiser l'ensemble de mes données et limiter les biais.

Dans le script écrit sous R utilisant le package « *momocs* », j'ai utilisé la fonction *coo-efourrier* avec les paramètres par défaut comme un nombre de points de 12 que l'on peut visualiser sur la figure 49. Le résultat de cette fonction *coo-efourrier* est une fonction que j'ai traduite en ACP. Mon indice de confiance sera traduit par une valeur propre « *eigenvalue* ». Plus cette valeur propre sera grande, meilleur sera l'indice de fiabilité de l'analyse.

C/ Résultats

1- Résultat morphologiques

Résultat d'identification à l'aveugle : vérification de la validité des critères morphologiques utilisés.

Le tableau 1 en annexe 7 donne les résultats de l'identification à l'aveugle. Au début de l'étude, je voulais distinguer l'identification effectuée sur la morphologie générale de l'insecte et celle effectuée à partir du spicule. Très rapidement, vue la difficulté, je me suis aperçue qu'il me fallait les deux, ensemble, pour obtenir une identification plus sérieuse. Mais même de cette façon, l'identification effectuée sur la morphologie à l'aide de la clé d'identification de la Faune de France de Wagner et Weber (1964) doublée d'une observation du spicule ne satisfait aucun des deux critères de qualité que j'ai pu tester (la fiabilité et la reproductibilité). La reproductibilité a été calculée en fonction des résultats des quatre opérateurs. Les résultats divergent suivant l'utilisateur, qu'il soit spécialiste ou peu entraîné à la clé. La reproductibilité calculée pour les 4 testeurs est de 54 % environ pour l'identification à l'espèce (Tableau 11) soit environ une identification conforme à l'attendu sur deux. Ce chiffre monte à 82% si

on se limite à l'identification des trois groupes d'espèces définis précédemment (*L. rugulipennis* / *L. pratensis* / *L. gemellatus*), ce qui est bien meilleur mais pas encore optimal. Concernant la répétabilité ou fiabilité, c'est-à-dire ici la capacité de l'opérateur dans les mêmes conditions à donner chaque fois la même réponse, le résultat n'est guère meilleur avec une répétabilité de 62% pour le spécialiste reconnu (qui a répété 3 fois l'identification à des temps différents) et de 40% pour l'étudiant (qui a répété l'action deux fois à des temps différents). Ce taux atteint 70% à 80% environ au niveau des groupes d'espèces. Ces résultats montrent qu'il existe une énorme difficulté à attribuer un nom d'espèce constant, donc fiable à un spécimen quelconque. On peut plus facilement placer le spécimen dans un groupe d'espèces: soit *gemellatus/italicus/maritimus*, soit *pratensis/punctatus/wagneri*, soit *rugulipennis* grâce au spicule.

Tableau 11 : Résultats de fiabilité et de reproductibilité des observations morphologiques. J.F. = Jérémie Fandos a répété deux fois l'identification à l'aveugle (x/2). J.C.S. = Jean-Claude Streito a répété trois fois l'identification à l'aveugle (x/3). La reproductibilité a été calculée à partir des informations des 4 testeurs (x/4) (A. Matocq, E. Pierre, J. Fandos (1^{ère} identification), et Jean-Claude Streito (1^{ère} identification).

ID	Fiabilité = Répétabilité				Reproductibilité	
	J.F.	J.C.S.	J.F.	J.C.S.	par espèce	par groupe
	par espèce	par espèce	par groupe	par groupe		
JSTR04652_0105	2/2	0/3	2/2	2/3	3/4	4/4
JSTR00469_0301	2/2	3/3	2/2	3/3	3/4	4/4
JSTR00275_0801	0/2	1/3	2/2	1/3	1,5/4	3,5/4
JSTR00699_0501	2/2	3/3	2/2	3/3	3/4	4/4
JSTR02115_0101	1/2	3/3	1/2	3/3	2/4	3,5/4
JSTR05533_0101	1/2	0/3	2/2	3/3	2/4	4/4
JSTR00699_0101	2/2	3/3	2/2	3/3	4/4	4/4
JSTR03797_0101	0/2	0/3	2/2	0/3	0/4	1,5/4
JSTR00270_1402	0/2	3/3	2/2	3/3	2/4	4/4
JSTR02049_0102	1/2	2/3	2/2	3/3	2/4	4/4
JSTR05140_0101	1/2	0/3	2/2	3/3	1/4	4/4
JSTR03732_0101	0/1	3/3	1/1	3/3	3/4	4/4
JSTR05209_0101	0/2	2/3	2/2	3/3	2/4	4/4
JSTR03391_0201	0/2	3/3	1/2	3/3	3/4	4/4
JSTR05588_0101	0/2	0/3	0/2	1/3	0/4	0,5/4
JSTR02198_0101	2/2	3/3	2/2	3/3	4/4	4/4
JSTR04684_0101	2/2	3/3	2/2	3/3	3/4	3/4
JSTR01971_0101	0/2	3/3	0/2	3/3	3/4	3,5/4
JSTR03405_0101	0/2	0/3	0/2	0/3	0/4	0/4
JSTR00269_0801	0/2	3/3	0/2	3/3	3/4	3,5/4
JSTR04652_0104	0/2	0/3	0/2	0/3	1/4	2,5/4
JSTR03365_0101	0/2	2/3	0/2	2/3	1/4	3/4
JSTR02077_0101	2/2	3/3	2/2	3/3	3/4	3/4
23 ID =100%	18/45 = 40%	43/69 = 62,3%	31/45 =68,8%	54/69 = 78,2%	49,5/92 = 53,8%	75,5/92 = 82%

Il en résulte que les identifications sont vraiment très difficiles à faire et très variables d'une personne à une autre et pour une personne donnée, d'un moment à un autre. L'identification morphologique apparaît peu fiable et ce, malgré toutes les précautions prises. Ce problème va impacter mon étude mais il est difficile dans l'état des connaissances actuelles de le résoudre. J'ai, par contre, essayé de le contourner en recherchant par des méthodes complètement différentes et indépendantes de la morphologie (biologie moléculaire et morphométrie) s'il existait des clades robustes au sein du genre *Lygus* dans ma zone d'étude. Dans les résultats que je vais exposer à présent, il faut toujours garder à l'esprit que l'identification spécifique des spécimens est entachée d'une fiabilité médiocre.

2- Résultats moléculaires

2-1-Barcodeing

Dans un premier temps, avant toute étude, j'ai recensé l'ensemble des séquences du gène COI établies dans notre base de données Arthémis pour des spécimens mâles et femelles du genre *Lygus* (soit 135 séquences pour 12 espèces de *Lygus*). Sur l'ensemble de ces séquences, j'ai construit un arbre phylogénétique en Neighbour-Joining (NJ), avec le modèle d'évolution « Kimura 2 paramètres » (K2P), 1000 réplifications (Figure 2 en annexe 10). Ce premier arbre constitue une étape préliminaire à toutes les autres analyses qui a permis de déterminer les échantillons à étudier ainsi que les groupes frères mais également les différentes techniques à aborder en fonction de la bibliographie effectuée.

Un second arbre ne contenant que les séquences COI des mâles a été établi avec la méthode de maximum de vraisemblance (ML) (voir Figure 51). Dans l'arbre préliminaire, on peut constater que les clades sont généralement peu supportés et qu'il existe des mélanges entre espèces. Les femelles ajoutent de la confusion dans cet arbre comme par exemple le numéro JSTR00273_0502 une femelle de *L. wagneri* des Alpes-de-Haute-Provence qui se retrouve avec des *L. punctatus* du Mercantour car celle-ci a été mal identifiée, et il est donc difficile d'établir des groupes bien définis. Par contre, on voit bien un groupe incluant les espèces américaines et les *L. rugulipennis* se détacher nettement (valeur de bootstrap, BP = 90) des autres espèces européennes.

A partir de l'arbre établi en ML avec les séquences COI des individus mâles (Figure 51), on peut dire que les espèces du groupe *gemellatus/italicus/maritimus* en vert et du groupe *pratensis/wagneri/punctatus* en rouge forment un même clade soutenu (BP = 100), de même les individus de l'espèce américaine *L. vanduzeei* se regroupent tous entre eux (BP = 99). Ensuite, il existe un bloc regroupant les autres espèces américaines (en jaune orangé), et les espèces holarctiques comme *L. rugulipennis* (en bleu) ainsi que *L. punctatus* des localités du Mercantour (en noir). Les échantillons de *L. lineolaris* (espèce américaine) semblent être paraphylétiques. En Neighbour-Joining, cette séparation des deux clades (Europe et Amérique) est plus soutenue (BP = 98) (voir figure 1 en annexe 10).

Les distances génétiques K2P calculées entre toutes les espèces (tableau 12) montrent qu'il existe peu de différences entre les espèces *gemellatus*, *italicus* et *maritimus* (0%). De même, à l'intérieur du groupe *pratensis/wagneri* et *punctatus*, les variations sont faibles (0,2%) sauf pour les spécimens que nous avons identifiés comme *L. punctatus*. En effet, il existe des variations importantes de l'ordre de 3% entre les spécimens supposés appartenir à cette espèce. Dans l'arbre, ils se placent à deux endroits très différents : avec les espèces américaines, ou avec le groupe *pratensis/wagneri* en rouge sur la figure 51. Les variations intraspécifiques sont du même ordre dans toutes les espèces (tableau 13) sauf pour *L. punctatus* pour laquelle la distance est de l'ordre de 3,3% (en raison de ces deux clades).

Tableau 12 : Matrice de distance K2P interspécifique avec les écarts types représentés en bleu, la distance minimale interspécifique est notée entre crochets. Matrice calculée selon le protocole cité dans Matériels et Méthodes généraux.

<i>Lygus gemellatus</i>		0,000	0,000	0,002	0,002	0,005	0,009	0,001	0,009	0,009	0,009	0,010	0,016	0,015
<i>Lygus italicus</i>	0,000 [0]		0,000	0,002	0,002	0,005	0,009	0,001	0,009	0,009	0,009	0,010	0,016	0,015
<i>Lygus maritimus</i>	0,000 [0]	0,000 [0]		0,002	0,002	0,005	0,009	0,001	0,009	0,009	0,009	0,010	0,016	0,015
<i>Lygus pratensis</i>	0,005 [0,002]	0,005 [0,003]	0,005 [0,002]		0,001	0,005	0,009	0,002	0,009	0,009	0,009	0,009	0,016	0,015
<i>Lygus wagneri</i>	0,004 [0,002]	0,004 [0,003]	0,004 [0,002]	0,002 [0]		0,005	0,009	0,002	0,009	0,009	0,009	0,009	0,016	0,015
<i>Lygus punctatus</i>	0,030 [0,002]	0,030 [0,003]	0,030 [0,002]	0,029 [0,002]	0,028 [0]		0,005	0,005	0,008	0,007	0,005	0,005	0,015	0,014
<i>Lygus rugulipennis</i>	0,057 [0,047]	0,057 [0,047]	0,057 [0,047]	0,056 [0,047]	0,056 [0,047]	0,032 [0,006]		0,009	0,008	0,006	0,002	0,003	0,015	0,015
<i>Lygus Sp.</i>	0,002 [0,002]	0,002 [0,002]	0,002 [0,002]	0,004 [0,003]	0,004 [0,003]	0,031 [0,005]	0,057 [0,047]		0,009	0,009	0,009	0,010	0,016	0,015
<i>Lygus vanduzeei</i>	0,054 [0,054]	0,054 [0,054]	0,055 [0,054]	0,058 [0,052]	0,057 [0,057]	0,053 [0,049]	0,045 [0,039]	0,054 [0,054]		0,008	0,008	0,009	0,015	0,015
<i>Lygus lineolaris</i>	0,050 [0,049]	0,050 [0,049]	0,051 [0,049]	0,052 [0,047]	0,052 [0,051]	0,042 [0,031]	0,028 [0,021]	0,050 [0,049]	0,041 [0,039]		0,006	0,006	0,015	0,014
<i>Lygus elisus</i>	0,055 [0,052]	0,054 [0,052]	0,055 [0,052]	0,053 [0,051]	0,053 [0,051]	0,031 [0,008]	0,009 [0,006]	0,055 [0,052]	0,045 [0,044]	0,028 [0,026]		0,003	0,014	0,014
<i>Lygus bradleyi</i>	0,065 [0,062]	0,064 [0,062]	0,064 [0,062]	0,063 [0,061]	0,063 [0,061]	0,039 [0,015]	0,014 [0,011]	0,064 [0,062]	0,052 [0,049]	0,036 [0,033]	0,016 [0,008]		0,015	0,015
<i>Apolygus Outgroup1</i>	0,141 [0,141]	0,141 [0,141]	0,141 [0,141]	0,139 [0,139]	0,139 [0,139]	0,132 [0,126]	0,127 [0,124]	0,141 [0,141]	0,137 [0,137]	0,128 [0,124]	0,122 [0,119]	0,131 [0,124]		0,016
<i>Orthops Outgroup2</i>	0,127 [0,127]	0,127 [0,127]	0,127 [0,127]	0,132 [0,129]	0,132 [0,131]	0,129 [0,127]	0,126 [0,119]	0,129 [0,129]	0,129 [0,129]	0,111 [0,107]	0,124 [0,118]	0,131 [0,123]	0,156 [0,156]	

Tableau 13 : Matrice de distance intra-spécifique à partir des séquences COI avec le modèle d'évolution K2P.

	d	écart-type	distance intraspécifique maximum
<i>Lygus gemellatus</i>	0,0005	0,0003	0,003
<i>Lygus italicus</i>	0,0000	0,0000	0
<i>Lygus maritimus</i>	0,0004	0,0004	0,002
<i>Lygus pratensis</i>	0,0020	0,0010	0,006
<i>Lygus wagneri</i>	0,0009	0,0009	0,002
<i>Lygus punctatus</i>	0,0333	0,0058	0,056
<i>Lygus rugulipennis</i>	0,0036	0,0012	0,012
<i>Lygus sp</i>	n/c	n/c	
<i>Lygus vanduzeei</i>	0,0000	0,0000	0
<i>Lygus lineolaris</i>	0,0026	0,0013	0,006
<i>Lygus elisus</i>	0,0082	0,0028	0,012
<i>Lygus bradleyi</i>	0,0191	0,0040	0,025
<i>Apolygus Outgroup1</i>	n/c	n/c	
<i>Orthops Outgroup2</i>	n/c	n/c	

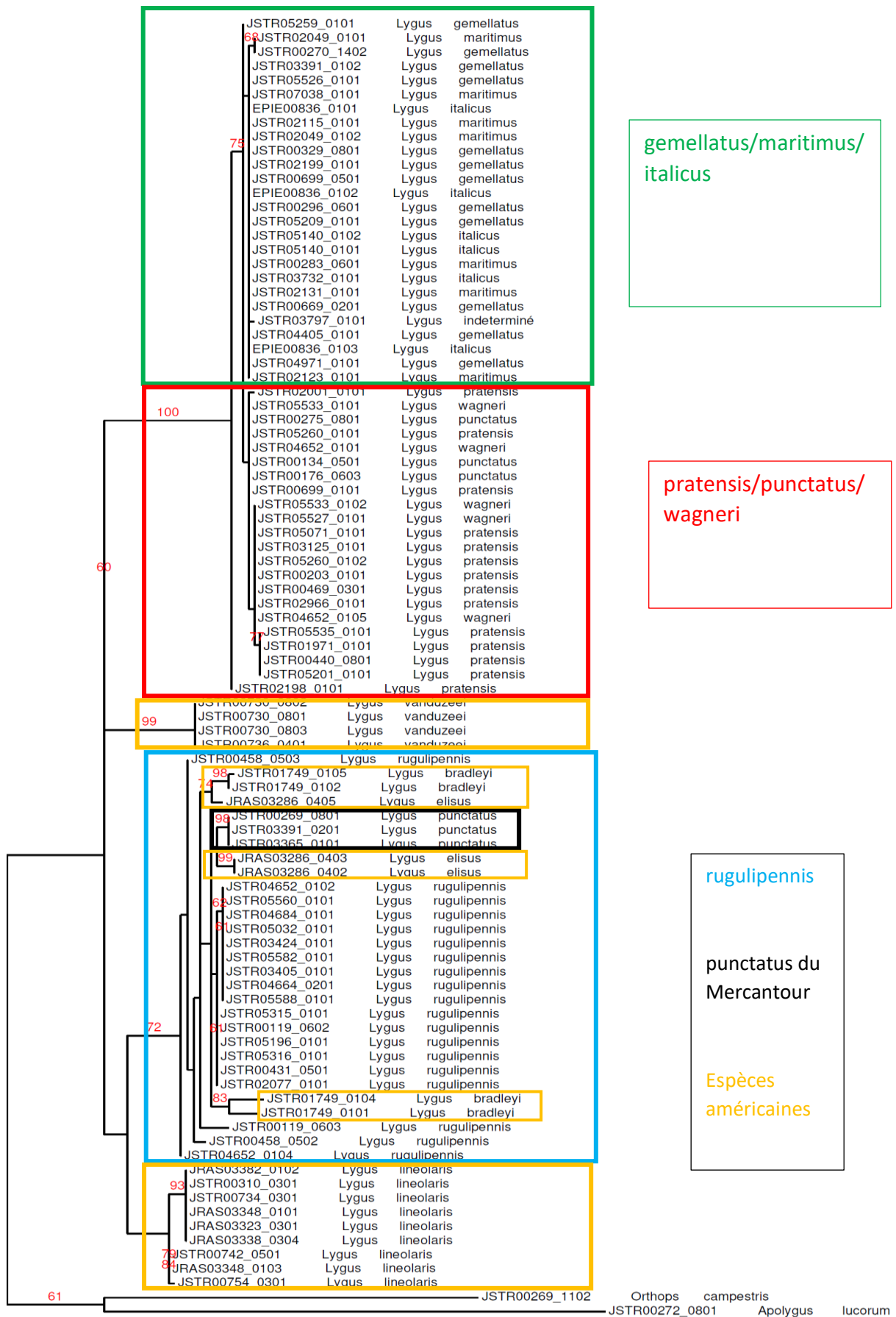


Figure 51 : Arbre ML reconstruit à partir des séquences COI sur les échantillons mâles sous CIPRES avec 1000 répliquions de bootstrap.

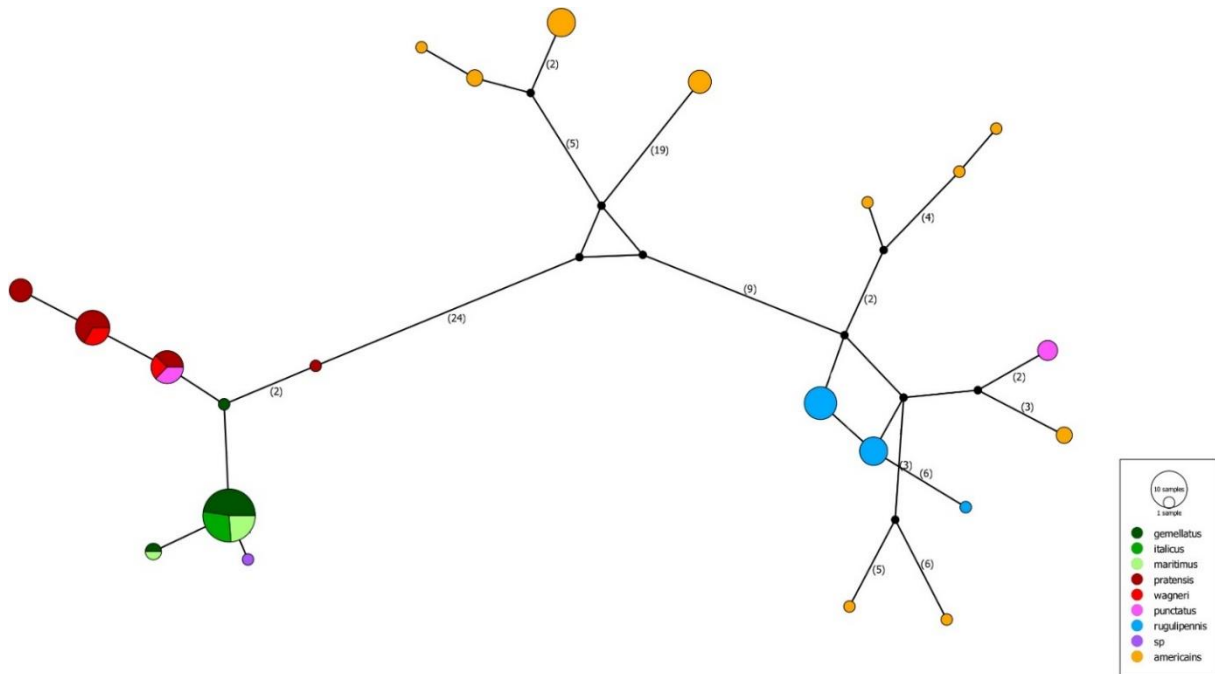


Figure 52 : Réseau d'haplotypes effectué sur 84 séquences COI.

Les distances génétiques sont très faibles entre les espèces européennes mais aussi entre certaines espèces américaines. Dans le cas de *L. rugulipennis*, certains spécimens appartenant à la même population (prélevés ensemble le même jour au même endroit, par exemple JSTR04652_0102 et JSTR04652_0104) se placent dans deux groupes différents peu soutenus. Il s'agit de la seule espèce présente en Europe que l'on différencie sans ambiguïté des autres taxons sur la base du gène COI (si on fait abstraction des *L. punctatus* du Mercantour dont l'identité sera discutée plus loin). Au final, on voit bien que le gène COI n'est pas suffisant pour discriminer les espèces de ce genre et qu'il est nécessaire d'intégrer d'autres gènes.

Avec la représentation en réseaux d'haplotypes (Figure 52), on distingue très nettement une séparation de 24 différences entre les espèces paléarctiques représentées en dégradé de rouge et en dégradé de vert et les espèces néarctiques et holarctiques représentées en jaune orangé et bleu. Les échantillons du Mercantour se regroupent également nettement avec les *L. rugulipennis* (représentés en bleu).

2-2 Autres gènes mitochondriaux analysés

2-2-1. Le cytochrome b : Cytb

Sur l'arbre du Cytb (434 pb) reconstruit en Neighbour-Joining (Figure 3 Annexe 10), il existe une dichotomie très soutenue (BP =99) entre les espèces paléarctiques (*L. gemellatus*, *L. maritimus*, *L. italicus*, *L. pratensis*, *L. wagneri*, *L. punctatus*) et les espèces américaines et *L. rugulipennis*. Cette dichotomie est moins visible sur l'arbre reconstruit en Maximum de vraisemblance (BP = 76 ; Figure 1 annexe 9) (BP = 76) et il existe des exceptions : on retrouve des spécimens de *L. gemellatus* soulignés et encadrés dans l'espèce *L. rugulipennis*. On a deux échantillons de *L. pratensis* qui se retrouvent au milieu de *L. rugulipennis*. Au niveau des espèces américaines, les *L. lineolaris* forment un clade (BP =

78) de même que les *L. vanduzeei* soutenu plus fortement (BP = 99). Les résultats des différents arbres reconstruits à partir des séquences de Cytb ne sont pas très concluants. Le gène Cytb est encore moins à même de différencier les taxons du genre *Lygus* que le COI. Les espèces des USA et holarctiques et les espèces européennes sont séparées mais il existe beaucoup d'exceptions. Les *L. punctatus* du Mercantour en noir se retrouvent toujours au milieu des espèces américaines et des *L. rugulipennis*.

Même si elles sont plus importantes que celles calculées à partir de COI, les distances génétiques (Tableau 1 annexe 11) sont toujours aussi faibles à l'intérieur de certaines espèces comme *L. maritimus* ou *L. rugulipennis* et fortes chez *L. punctatus* (6% avec 2 groupes séparés dans l'arbre reconstruit) ainsi que chez *L. wagneri* (7% avec 3 groupes différents dans l'arbre phylogénétique).

En considérant le réseau d'haplotypes (figure 1 annexe 12), il existe beaucoup de différences (N = 24) séparant le groupe européen du groupe américain. On peut également constater que des échantillons de *L. punctatus* du Mercantour partagent des haplotypes de *L. rugulipennis*.

2-2-2. NADH-ubiquinone oxidoreductase 5: ND5

Avec les séquences issues de l'alignement ND5 (744 pb), on retrouve un patron proche de celui obtenu avec le gène COI, avec les groupes europe et américain/holarctique, séparés assez fortement (BP = 98). Pour le gène ND5, aucun groupe externe n'a pu être amplifié, ce qui pose un problème pour l'enracinement de l'arbre. Au vu des précédents arbres reconstruits, j'ai mis les espèces américaines comme groupes externes, ce qui permet d'avoir une topologie similaire à celle de l'arbre COI. On observe encore : i) que les *L. rugulipennis* se répartissent en deux clades, ii) qu'il existe toujours les trois échantillons de *L. punctatus* du Mercantour qui se regroupent ensemble dans un des groupes de *L. rugulipennis*, que le spécimen JSTR05209_0101 (*L. gemellatus*) se retrouve comme pour le Cytb avec un groupe de *L. rugulipennis*. ND5 sépare également très correctement (BP = 99) les espèces américaines *L. vanduzeei* et *L. lineolaris*. Un individu de *L. wagneri* sort du clade formé par les *Lygus* paléarctiques.

Avec les distances génétiques, on obtient une moindre large gamme de différenciation intra-spécifique sauf pour *L. punctatus* (toujours!) et pour les mêmes raisons, les échantillons du Mercantour se regroupent dans un clade différent des autres *L. punctatus* paléarctiques.

Avec la représentation en réseaux d'haplotypes (figure 2 en annexe 12), on distingue nettement trois groupes. Les deux premiers rassemblent les espèces européennes *L. pratensis/L. wagneri/L. punctatus* et *L. gemellatus/ L. maritimus/L. italicus*. L'individu indéterminé se retrouve entre ces deux groupes. Ensuite, il existe un autre groupe formé par les échantillons américains, les *L. rugulipennis* et les échantillons de *L. punctatus* du Mercantour.

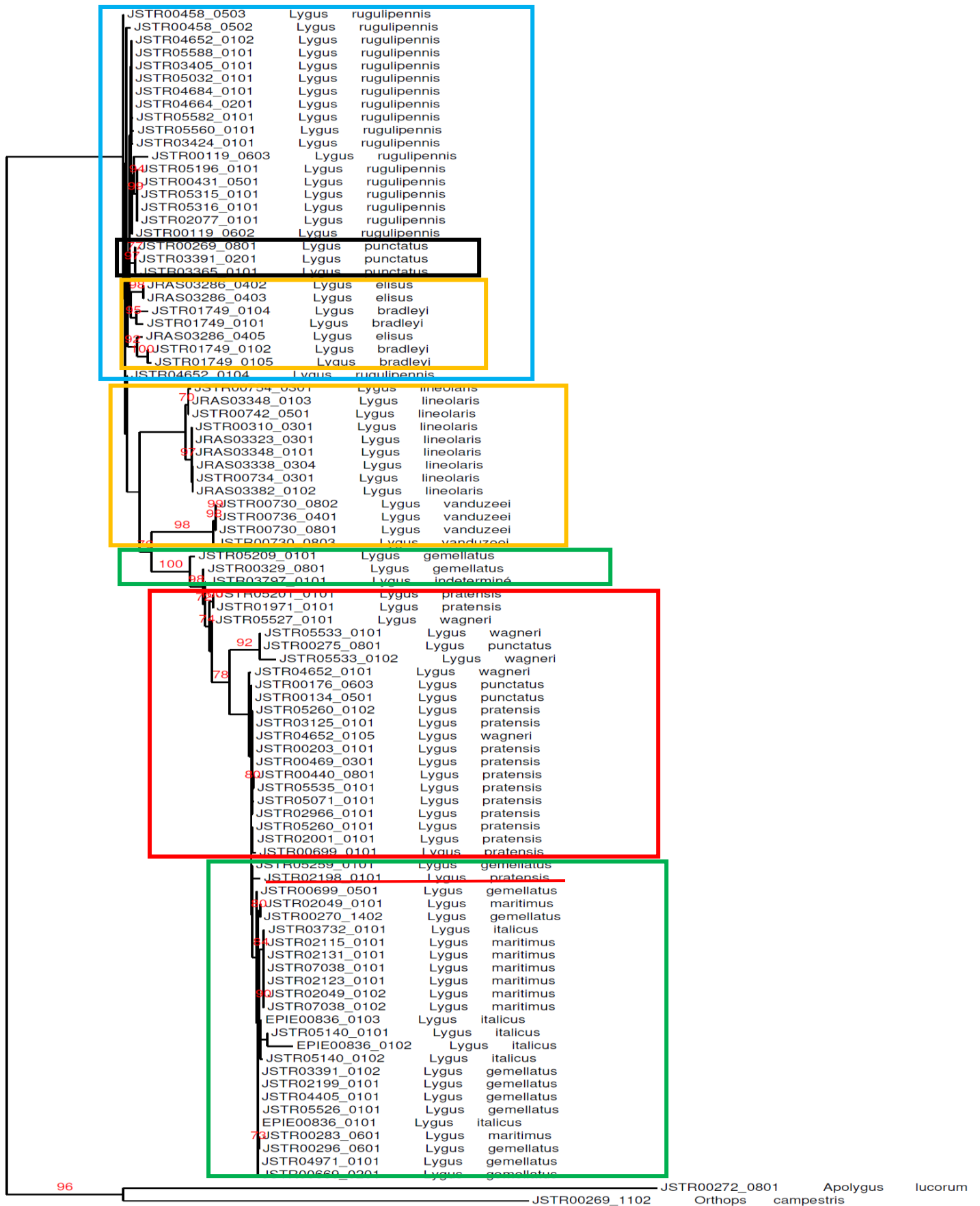
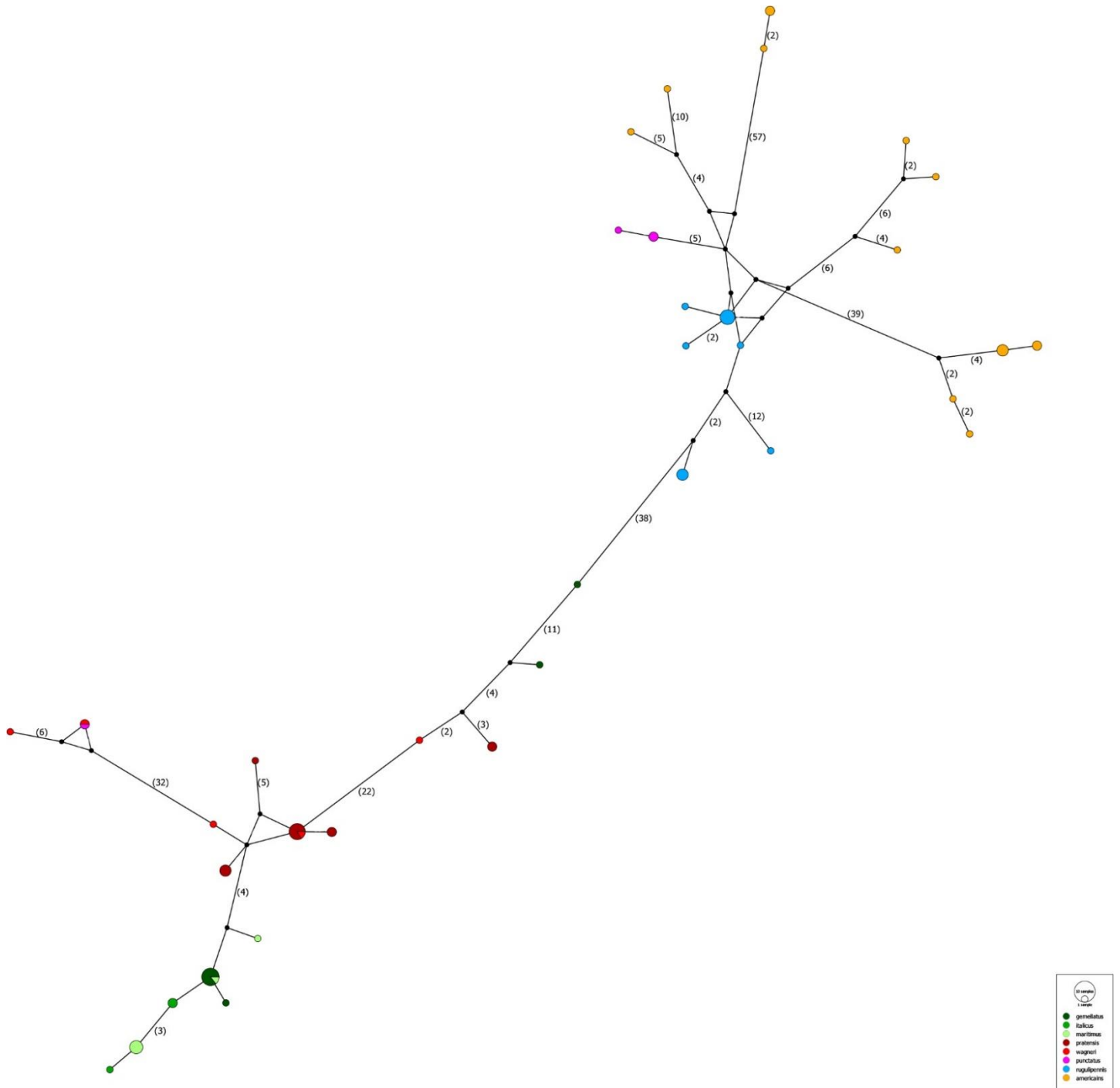


Figure 53 : Arbre phylogénétique reconstruit avec les séquences mitochondriales concaténées (1836 pb) sous CIPRES en ML avec 1000 répliquations de bootstrap. En bleu, *L. rugulipennis*, en rouge ; le groupe *L. pratensis*/*L. wagneri*/*L. punctatus* ; en vert le groupe *L. gemellatus*/*L. maritimus*/*L. italicus* ; en noir, *L. punctatus* du Mercantour ; en jaune les espèces américaines.

2-3 Concaténation des gènes mitochondriaux

Pour améliorer et mieux visualiser les relations entre les différentes espèces, une concaténation des gènes mitochondriaux (1836pb) a été effectuée. Le meilleur partitionnement des données, tel qu'obtenu par le logiciel PartitionFinder donne 2 partitions. Un arbre en maximum de vraisemblance a été reconstruit (figure 53) en incluant ces différentes partitions.



Une première dichotomie visible sépare le groupe des espèces européennes (BP = 76) et *L. vanduzeei* (BP = 98) du reste de l'échantillonnage. Un nœud (BP = 65) sépare le clade formé par les espèces

américaines *L. elisus* et *L. bradleyi*, *L. rugulipennis* et les spécimens de *L. punctatus* du Mercantour (ensemble soutenu par un BP de 79%), du clade formé par *L. vanduzeei* et les espèces purement européennes. Ce dernier clade « européen » est en revanche très solide (BP = 98). Les spécimens des différentes espèces / groupes d'espèces y sont en revanche mal regroupés.

Les matrices de distances confirment les résultats observés avec les gènes pris individuellement.

Avec la représentation en réseaux d'haplotypes (Figure 54), on retrouve les grands groupes déjà observés lors des analyses phylogénétiques précédentes :

- une séparation claire entre les espèces européennes d'un côté et les espèces américaines + *L. rugulipennis*,
- les espèces européennes se scindent plus clairement en deux groupes (les mêmes que ceux observés précédemment) : les espèces à petits spicules *L. gemellatus/L. maritimus/L. italicus* et celles à gros spicules dont l'apex est spatulé *L. pratensis/L. wagneri/L. punctatus*,
- *L. punctatus* pose toujours le même problème avec des spécimens qui se regroupent avec *L. pratensis/L. wagneri* et les spécimens du Mercantour qui appartiennent vraisemblablement à une autre entité taxonomique et se groupent avec les espèces américaines et relativement loin de *L. rugulipennis*.

2-4 Autres gènes nucléaires

2-4-1 Le Domaine D2 du 28S ribosomique

Le gène 28S (709 pb) n'apporte rien de plus (Figure 3 annexe 9). Peu de spécimens d'espèces américaines ont donné une séquence et ceux-ci se placent dans deux groupes différents (un échantillon de *L. elisus* dans le groupe *L. rugulipennis* et les autres – *L. lineolaris* – dans le groupe *L. gemellatus/L. italicus/L. maritimus*. Par contre, les *L. rugulipennis* ne forment qu'un seul clade au lieu de deux avec les gènes mitochondriaux. Les *L. punctatus* du Mercantour se regroupent proches des *L. rugulipennis* comme avec les gènes mitochondriaux. Et l'individu de *L. gemellatus* JSTR05209_0101 se regroupe encore avec les *L. rugulipennis*.

Les distances intra- ou interspécifiques sont très faibles comme le montrent les deux tableaux (tableau 5 et tableau 6 de l'annexe 11). A l'intérieur des espèces *L. gemellatus* et *L. punctatus*, les valeurs les plus élevées sont dues pour *L. gemellatus* au spécimen JSTR05209_0101 (voir ci-dessus) et pour *L. punctatus* aux trois échantillons du Mercantour qui se placent toujours avec les *L. rugulipennis* et les espèces américaines. Il n'existe que 5% - 6% de différence interspécifique entre les outgroups et les espèces du genre *Lygus*.

La représentation en réseaux d'haplotypes (Figure 3 annexe 12) illustre le peu de différences qui existent entre toutes les espèces de *Lygus*. En incluant 12 séquences 28S issues de la littérature (Roerhdanz et al, 2014) à nos séquences, le réseau illustré en figure 55 est obtenu. On observe que les haplotypes des espèces américaines sont inclus dans ceux européens et qu'il n'existe qu'une substitution de différence pour séparer les deux haplotypes « américains ».

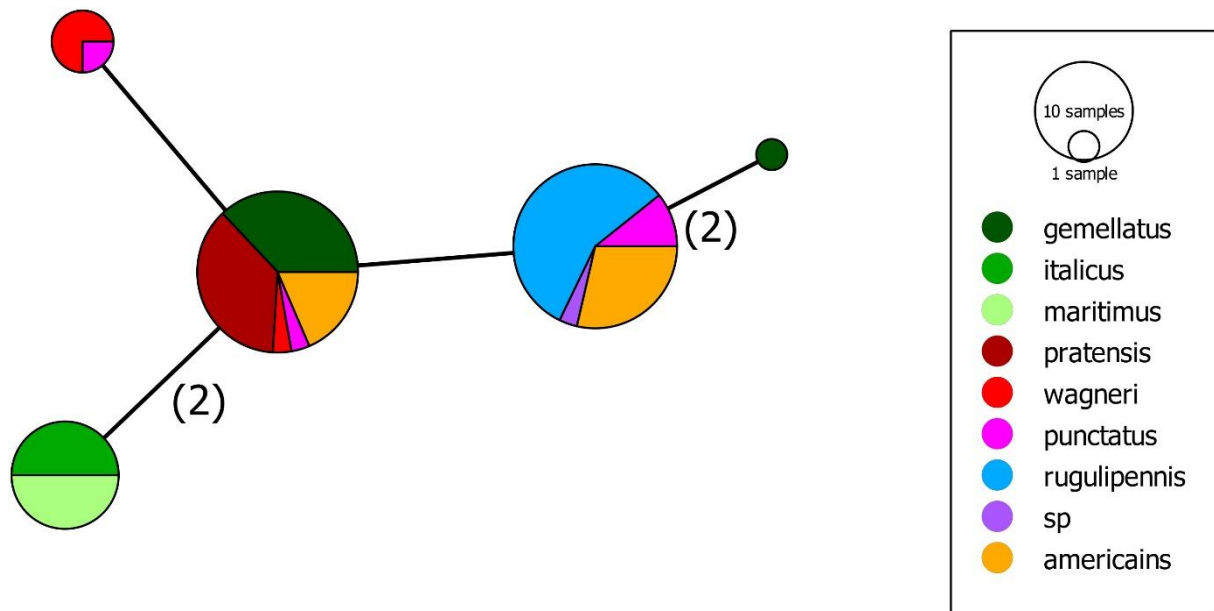


Figure 55 : Réseau d'haplotypes construit à partir des séquences 28S du gène de la littérature couplées à celles de notre étude.

2-4-2. Internal Transcribed Spacer : ITS

L'arbre en maximum de vraisemblance (figure 4 annexe 9) construit à partir des séquences d'ITS (1058pb) montre une séparation nette entre les *L. rugulipennis* et les autres espèces françaises (le nœud entre espèces américaines / holarctiques et espèces européennes est soutenu à 100%). De plus, ce gène permet de séparer *L. pratensis*, *wagneri*, *punctatus* de *L. gemellatus*, *maritimus*, *italicus*. Mais à l'intérieur de chaque groupe, il existe encore un mélange de chacune des 3 espèces. Les espèces ne sont toujours pas clairement définies. Par contre, le groupe *gemellatus/maritimus/italicus* se retrouve dans deux clades fortement soutenus dont un qui regroupe essentiellement les individus appartenant aux espèces *L. maritimus* et *L. italicus*.

Avec ce gène, l'amplification des groupes externes a donné une séquence qui ne s'alignait pas du tout avec les séquences des *Lygus* et de plus, pour certains échantillons, la séquence n'était pas complète. Et j'ai dû éliminer un certain nombre de séquences incomplètes de mon alignement pour éviter de créer trop de bruit de fond. Ce faisant, j'ai éliminé des séquences d'espèces américaines et j'ai dû par ailleurs enraceriner l'arbre avec les échantillons de *L. bradleyi* (une autre espèce américaine).

On différencie bien les deux groupes habituels : Europe vs USA / holarctique. Il est curieux de constater que les échantillons de *L. vanduzeei* se rapprochent ici des espèces européennes (nœud soutenu à 90%). Les *L. punctatus* du Mercantour se regroupent toujours avec les espèces américaines (BP = 96). L'échantillon JSTR05209_0101 est toujours placé avec les *L. rugulipennis* qui forment un groupe bien homogène. Alors que les *L. pratensis/punctatus/wagneri* forment deux clades comme les *L. gemellatus/italicus* et *maritimus*. L'ensemble est très bien soutenu (BP = 100).

Avec les réseaux d'haplotypes (Figure 4 annexe 12), la séparation entre espèces européennes et américaines est visible (27 différences). Il existe neuf différences qui permet de séparer les *L. italicus* et

L. maritimus des autres *Lygus* (*L. pratensis*/*L. wagneri*/*L. punctatus*/*L. gemellatus* et certains individus de *L. maritimus*).

2-5 Concaténation des gènes nucléaires

La concaténation des séquences des gènes nucléaires a également été faite et donne un alignement de 1768pb. L'arbre en maximum de vraisemblance qui en résulte est représenté en figure 56. Certains échantillons notamment *L. lineolaris* n'ayant pas pu être séquencés intégralement (pour l'ITS en particulier) sont manquants. J'ai choisi de réunir ici seulement des séquences ne comprenant aucun N (aucune base indéterminée) pour éviter d'apporter plus de biais. Malgré cela, le groupe des espèces américaines/holarctiques apparaît encore assez bien soutenu avec une valeur de BP de 85. A l'intérieur de ce groupe, *L. rugulipennis* (incluant toujours le spécimen JSTR05209_0101 de *L. gemellatus*) ainsi que le clade des *L. punctatus* du Mercantour sont également solides. Les échantillons des espèces américaines se regroupent également très fortement et forment des clades bien différenciés (BP = 100 pour *L. elisus* ; BP = 98 pour *L. bradleyi* ; BP = 88 pour *L. lineolaris* et BP = 100 pour *L. vanduzeei*). Les échantillons de *L. gemellatus*, *L. maritimus* et *L. italicus* forment deux clades.

Au niveau du réseau d'haplotypes (Figure 57), les gènes nucléaires testés regroupent également *L. rugulipennis* avec les spécimens de *L. punctatus* du Mercantour. De même le groupe *pratensis/wagneri/punctatus* est bien individualisé contrairement au groupe *L. gemellatus/maritimus/italicus*. *Lygus gemellatus* se place en marge du groupe de *L. pratensis*. *Lygus italicus* et *L. maritimus* se groupent ensemble mais sans *L. gemellatus*. Un individu de *L. gemellatus* (JSTR05209_0101) se place au milieu des *L. rugulipennis*. Or la vérification de l'identification ne fait aucun doute, ce spécimen n'a rien à voir morphologiquement avec *L. rugulipennis*.

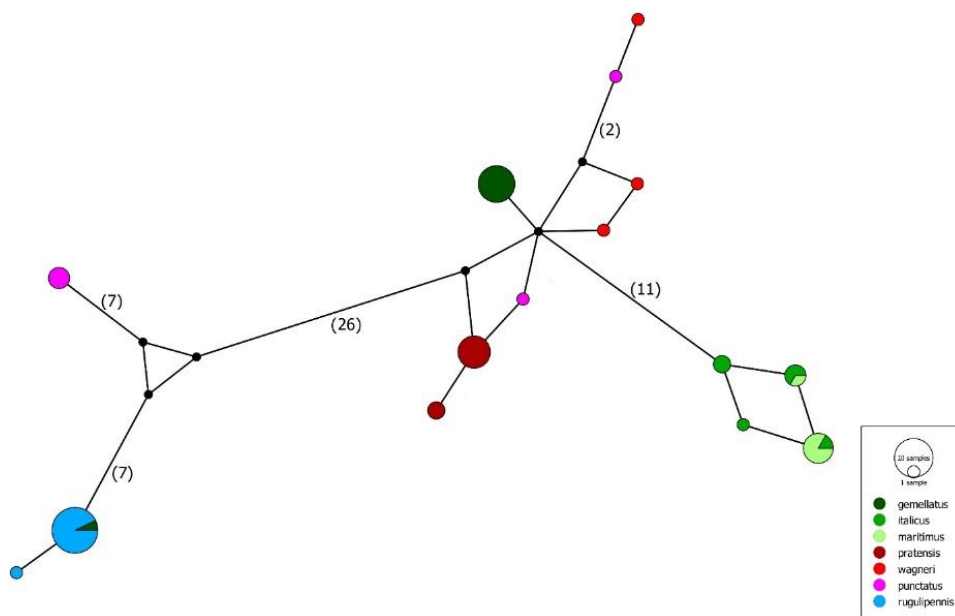


Figure 57 : Réseau d'haplotypes effectué sur l'ensemble des séquences nucléaires concaténées (1758pb) pour 53 échantillons de *Lygus*.

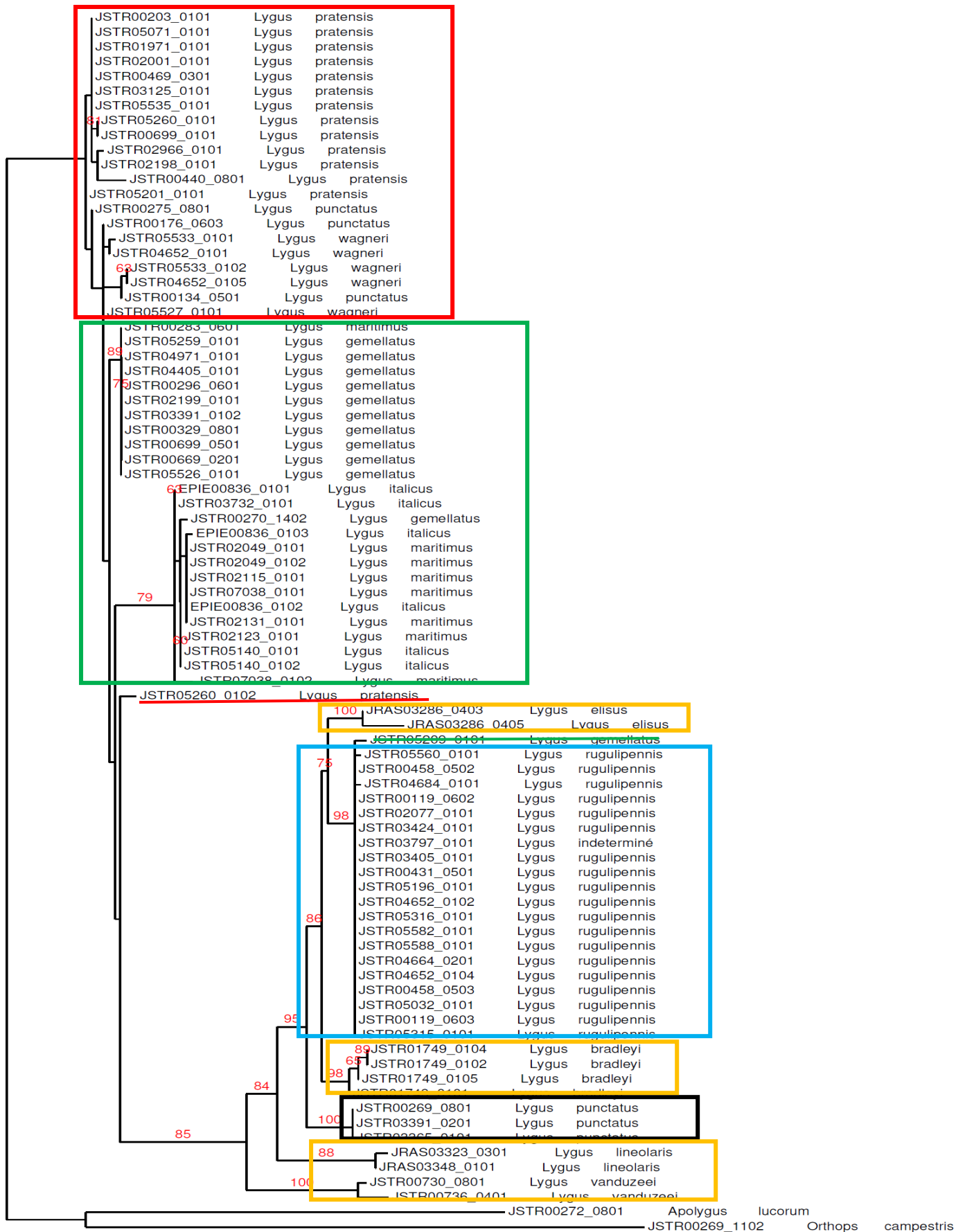


Figure 56 : Arbre phylogénétique effectué à partir des séquences concaténées (1768pb) de l'ensemble des gènes nucléaires sous CIPRES en ML avec 1000 répliquions de bootstrap.

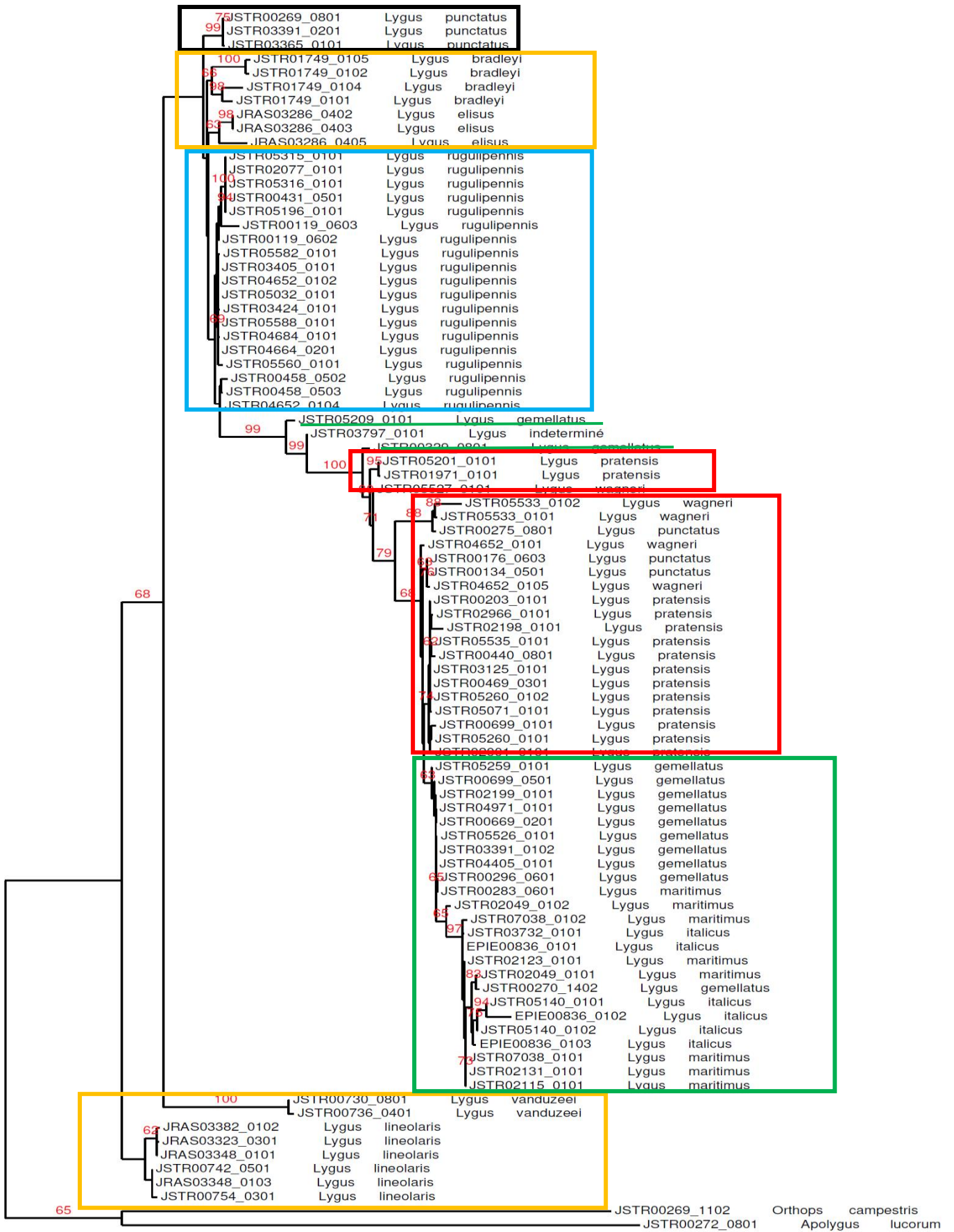


Figure 58 : Arbre phylogénétique reconstruit à partir de l'ensemble des séquences concaténées (3604pb) en ML sous CIPRES avec 1000 répliquions de bootstrap.

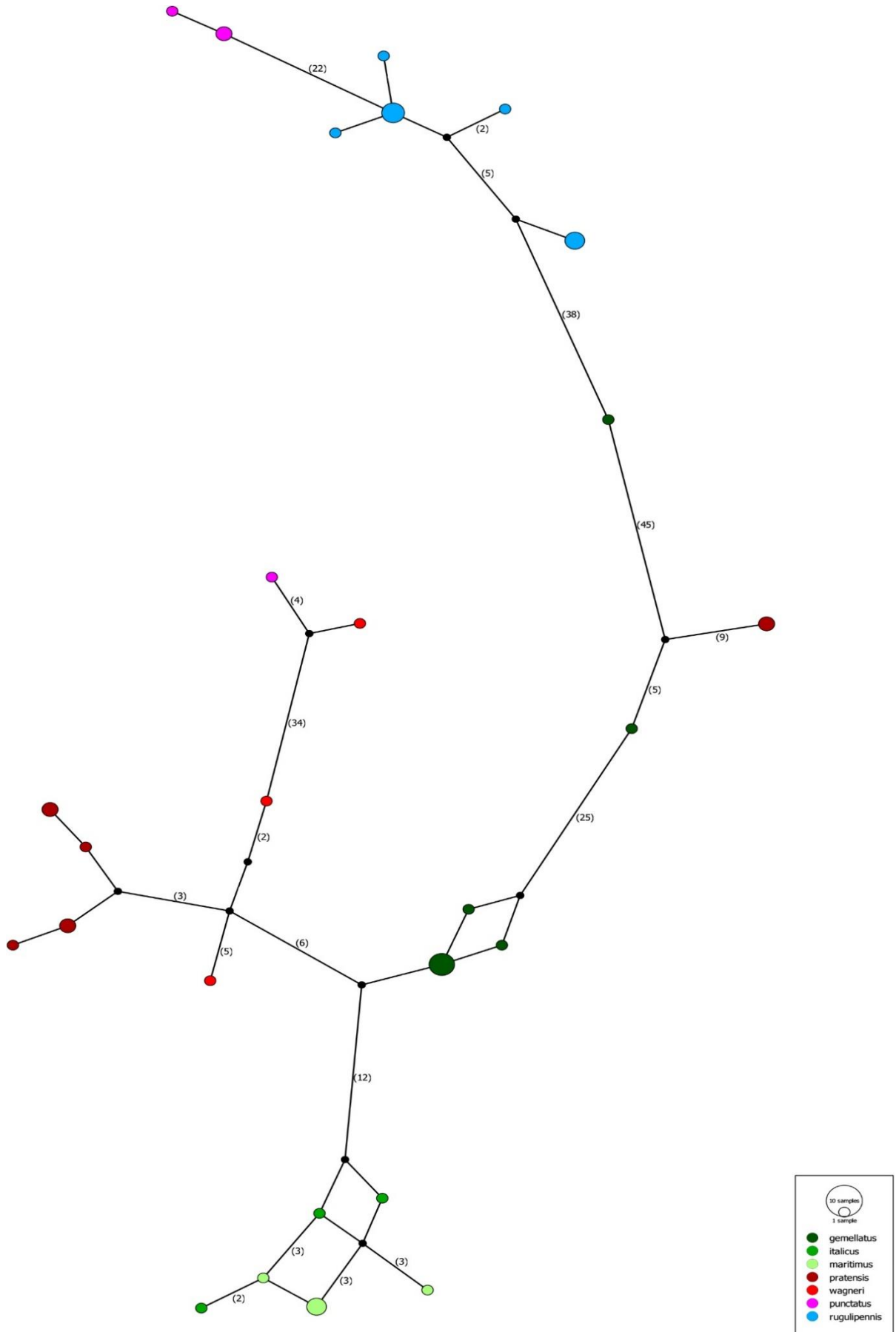


Figure 59: Réseau d'haplotypes effectué sur 42 échantillons de Lygus.

2-6 Concaténation de l'ensemble des gènes

La concaténation complète, c'est-à-dire sur l'ensemble des gènes m'a permis d'obtenir 3604 pb alignées. Un arbre (Figure 58) a été reconstruit par la méthode de maximum de vraisemblance sur les séquences concaténées de l'ensemble des gènes sans bases incertaines (N). Le groupe des espèces européennes est fortement supporté (BP = 99) mais aucun nœud important ne permet de différencier les espèces les unes des autres. En outre, il existe trois clades de *L. pratensis/L. wagneri* et deux clades de *L. gemellatus*. Les spécimens JSTR05209_0101 (*Lygus gemellatus*) et JSTR03797_0101 (*Lygus sp.*) se retrouvent séparés entre les espèces *L. rugulipennis* et les espèces *L. pratensis/punctatus/wagneri*. On retrouve toujours les *L. punctatus* du Mercantour à l'intérieur des espèces américaines mais ils forment un clade à part soutenu à 99%.

Avec la représentation en réseaux d'haplotypes (Figure 59), on retrouve de manière plus claire encore les groupes mis en évidence avec les gènes mitochondriaux. On obtient par contre deux groupes plus différenciés dans le groupe *L. gemellatus/maritimus/italicus* avec *L. gemellatus* d'un côté et *L. maritimus/italicus* ensemble de l'autre. L'analyse des réseaux d'haplotypes n'a pu être réalisée que sur 42 échantillons car il ne faut aucune donnée manquante pour faire ce genre de graphique.

Au vu des différentes représentations en réseau d'haplotypes, les *L. rugulipennis* sont bien à part ; j'ai donc construit des réseaux d'haplotypes en ne tenant compte que des espèces européennes sur les concaténations mitochondriales et nucléaires (Figures 5 et 6 annexe 12).

On peut constater à partir de l'ensemble des arbres reconstruits sous plusieurs méthodes et modèles d'évolution que les espèces américaines *L. lineolaris* et *L. vanduzeei* forment chacune un groupe bien séparé de l'ensemble des autres *Lygus*. Les *L. rugulipennis* et les *L. punctatus* issus du Mercantour se retrouvent dans le même clade avec les autres *Lygus* américains c'est-à-dire *L. bradleyi* et *L. elisus*. Ensuite toutes les autres espèces européennes *L. pratensis*, *L. wagneri*, *L. punctatus*, *L. gemellatus*, *L. italicus* et *L. maritimus* sont réunies dans un même clade, mais même dans l'arbre de concaténation, aucune des espèces n'apparaît bien supportée et caractérisée de manière fiable. Au-delà des incertitudes d'identification, les distances génétiques sont très faibles même quand on considère plus de 3000 paires de bases. On peut, par contre, certifier que le groupe des *Lygus* exclusivement européens est un groupe monophylétique.

Toutefois, trois spécimens identifiés (Tableau 14 et annexe 14) avec une forte incertitude changent de place en fonction des gènes étudiés. Ainsi l'échantillon JSTR05209_0101 qui a été identifié comme *L. gemellatus*, se regroupe très souvent avec les *L. rugulipennis*. Cet échantillon a pourtant été identifié à 100% comme *L. gemellatus* par les 3 taxonomistes au début de notre étude. L'identification morphologique montre, là encore, ses éventuelles limites. On voit également que l'échantillon JSTR03797_0101 se retrouve quelquefois avec le groupe *L. gemellatus/italicus/maritimus* et quelquefois avec *L. rugulipennis*. Morphologiquement, il n'était pas clair et sa position dans un ou

l'autre groupe pouvait être discutée. Enfin le spécimen JSTR00329_0801 se déplace également entre les groupes *L. gemellatus/italicus/maritimus* et *L. rugulipennis*. Ces trois individus passent de clades «gemellatus» à des clades «pratensis» ou «rugulipennis». Compte tenu des très faibles distances génétiques entre les spécimens identifiés « pratensis » et ceux identifiés « gemellatus » le passage d'un clade à l'autre n'est pas très surprenant. Le passage d'un clade «gemellatus» à un clade «rugulipennis» est plus étonnant. Si on se réfère au fait que la diversité génétique est nettement plus faible au sein d'une même espèce qu'entre les espèces, il est par conséquent impossible de lui attribuer un nom d'espèce précis. Il ne se retrouve pas dans un groupe bien particulier qui de plus change d'un gène à un autre sans que cela soit lié à la nature nucléaire ou mitochondriale du gène. Par ailleurs, chacun des trois spécimens change de clade différemment des autres. Dans l'analyse basée sur la concaténation de tous les gènes (3604 pb), les trois se placent à la base des autres espèces européennes et à part du clade «rugulipennis» et des espèces américaines.

Tableau 14 : Liste des positionnements dans les arbres phylogénétiques de trois échantillons *Lygus* en fonction des gènes étudiés : gem (clade gemellatus/maritimus/italicus) ; pra (clade pratensis/wagneri/punctatus) ; rug (clade rugulipennis) ; pra/rug (groupe à la base de pratensis/ wagneri/punctatus + gemellatus/maritimus/ italicus).

Spécimens	COI	Cytb	ND5	28S	ITS	Concat. Mt	Concat. Nucl	Concat. Total
JSTR00329_0801 <i>L. gemellatus</i>	gem	rug	gem	gem	gem	pra	gem	pra/gem
JSTR03797_0101 <i>Lygus</i> sp.	gem	rug	pra	rug	rug	pra	rug	pra/gem
JSTR05209_0101 <i>L. gemellatus</i>	gem	rug	rug	rug	rug	pra	rug	pra/gem

3- Résultats du RADseq

Le tableau 4 annexe 2 résume l'ensemble des données générées par le séquençage de la librairie. Le nombre de séquences obtenu est 519008459 après le passage sur les filtres d'Illumina. Après les différents traitements bio-informatiques, le nombre de séquences lues et attribuées à chaque individu est affiché dans la colonne « nb_reads_processradtags ». Seulement 12 individus sur les 32 séquencés peuvent servir à la suite de l'étude. Pour les autres, trop de séquences sont identiques, en grande partie en raison de l'étape d'enrichissement par PCR : pour ces individus, le nombre de clones de séquences dû aux duplications de séquences est de 100% alors qu'on a conservé en moyenne 34% des séquences exploitables après le premier filtre pour faire des analyses phylogénétiques.

Dans les tableaux 15 et 16, on peut constater que l'alignement concerne 2249 loci et que la proportion de sites informatifs est très faible (1%), de même que celle des sites variables (5%) sur le nombre de sites possibles (321607). Dans mon analyse, j'avais demandé à ce qu'au moins 8 échantillons partagent

les loci sélectionnés et ainsi la moyenne de site possible varie d'un échantillon à l'autre. Pour l'outgroup, 97% des sites ne sont pas pris en compte, par contre pour le JSR07979_0101 (*L. gemellatus*) seulement 4,8% des sites ne sont pas analysés.

Un arbre a été reconstruit (Figure 60) à partir de l'alignement de tous les sites possibles soit 321607 pb. La proportion de caractères complètement indéterminés dans cet alignement est de 30,18%, ce qui est relativement important pour le nombre d'échantillons sélectionnés (12 échantillons).

Tableau 15: Résumé des informations statistiques après analyses Stacks M2n10S8L100

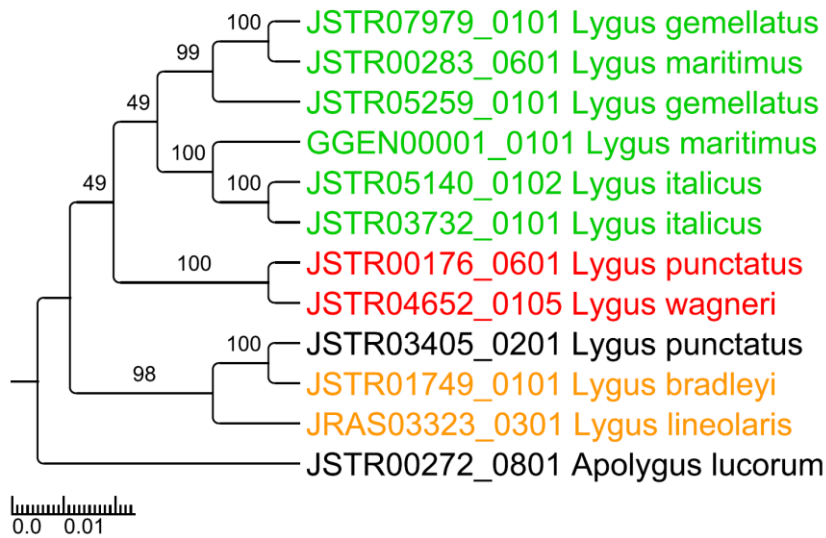
Stacks_Alignment_name.sel.phy	No_of_taxa	Alignment_length	Nb loci	Missing_percent	No_variable_sites	Proportion_variable_sites	Parsimony_informative_sites	Proportion_parsimony_informative	AT_content	GC_content
M2n10S8L100	12	321607	2249	30.18	17178	0.053	5416	0.017	0.54	0.46

Tableau 16 : Résumé des pourcentages de loci non utilisés par échantillon.

ID	taxon name	Sequence_length	Undetermined_characters	Missing_percent	AT_content	GC_content
GGEN00001_0101	<i>Lygus maritimus</i>	321607	24453	7.603	0.541	0.459
JRAS03323_0301	<i>Lygus lineolaris</i>	321607	42328	13.161	0.539	0.461
JSTR00176_0601	<i>Lygus punctatus</i>	321607	277849	86.394	0.543	0.457
JSTR00272_0801	<i>Apolygus lucorum</i>	321607	313170	97.377	0.536	0.464
JSTR00283_0601	<i>Lygus maritimus</i>	321607	157300	48.911	0.54	0.46
JSTR01749_0101	<i>Lygus bradleyi</i>	321607	30316	9.426	0.54	0.46
JSTR03405_0201	<i>Lygus punctatus</i>	321607	24024	7.47	0.539	0.461
JSTR03732_0101	<i>Lygus italicus</i>	321607	38896	12.094	0.541	0.459
JSTR04652_0105	<i>Lygus wagneri</i>	321607	30888	9.604	0.54	0.46
JSTR05140_0102	<i>Lygus italicus</i>	321607	138710	43.13	0.538	0.462
JSTR05259_0101	<i>Lygus gemellatus</i>	321607	68211	21.209	0.545	0.455
JSTR07979_0101	<i>Lygus gemellatus</i>	321607	18590	5.78	0.54	0.46

L'arbre reconstruit à partir des 2249 loci (Figure 60) ressemble à celui obtenu avec la concaténation de l'ensemble des séquences issues des différents gènes (Figure 58). En effet, les espèces américaines (en orange) se regroupent avec le *L. punctatus* du Mercantour. Il existe pourtant un problème car le pourcentage d'indétermination est important (86%) pour l'échantillon *L. punctatus* du Mercantour (JSTR00176_0601). Le nœud concernant cet individu peut donc raisonnablement être mis en doute. Pour les espèces *L. maritimus*, *L. gemellatus* et *L. italicus* chacune représentées par deux individus, il n'existe pas d'éléments permettant de les différencier correctement car les différences sont très faibles

(1%). On peut cependant observer deux clades faiblement supportés (BP = 49) et des clades fortement supportés (BP = 100) au sein du groupe *L. gemellatus/italicus/maritimus*. Malheureusement, il manque les résultats pour *L. pratensis* et *L. rugulipennis*, espèces qui étaient à l'origine dans le planning d'expérimentations au même titre que les autres. Malheureusement, après le premier script d'analyses, la proportion de PCR dupliquées était trop importante dans ces deux taxons pour avoir des séquences



«pures» exploitables par la suite.

Figure 60 : Arbre reconstruit en ML sous RaxML sur l'ensemble des loci déterminés variables après traitement bio-informatique RADIS. M2n10S8L100. En vert, le groupe *L. gemellatus/maritimus/italicus*. En rouge le groupe *L. punctatus/wagneri*; en orange; les espèces américaines. En noir l'individu *L. punctatus* du Mercantour.

4- Résultats morphométriques

4-1 Analyse des points homologues

Les analyses sur 15 points et 19 points donnent approximativement les mêmes résultats à

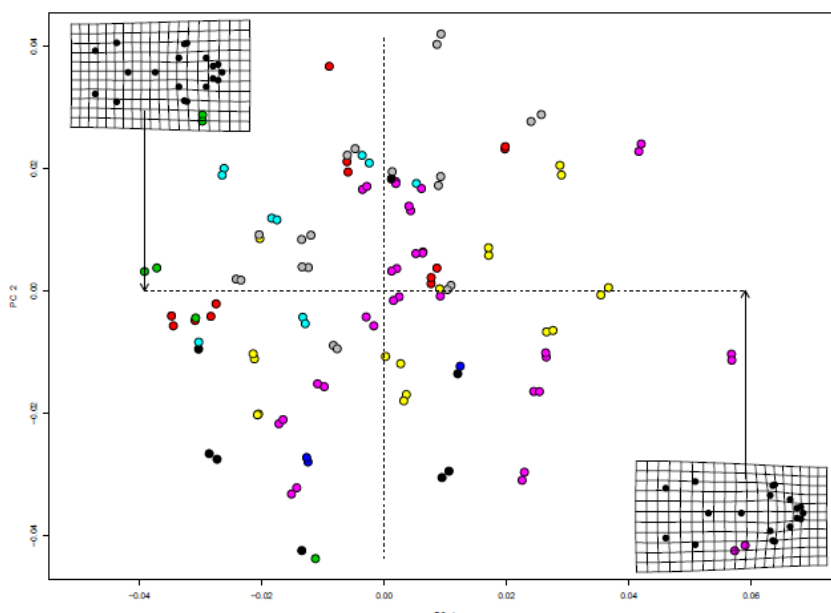


Figure 61 : Représentation de chaque échantillon répété deux fois selon une analyse procustéenne généralisée à partir de 19 points homologues. : en noir, les espèces américaines et l'échantillon indéterminé; en rouge, *L. gemellatus*, en vert, *L. italicus*, en bleu clair, *L. maritimus*, en jaune, *L. punctatus*, en bleu foncé, *L. wagneri*, en gris, *L. rugulipennis* et en rose, *L. pratensis*

savoir aucune structuration vraiment visible. Je ne donnerai dans mon rapport que les figures issues des analyses sur 19 points (figures 61 et 62). Mon taux d'erreur au niveau des placements des points est de l'ordre de 0,2% ce qui est négligeable. Cette analyse a été pratiquée deux fois, et les résultats donnent sensiblement la même topologie. Je n'ai pas estimé l'effet « expérimentateur » sur le

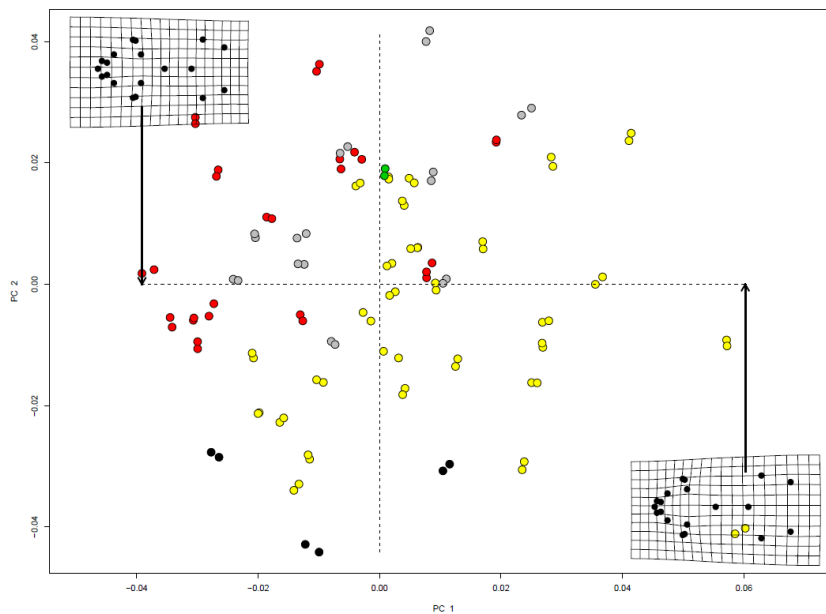


Figure 62 : Représentation des coordonnées de chaque échantillon répété deux fois mis par groupe selon une analyse procustéenne généralisée à partir de 19 points homologues : en noir, les espèces américaines, en vert, l'individu indéterminé, en rouge *L. gemellatus/maritimus/italicus*, en en jaune *L. pratensis/punctatus/wagneri* et en gris *L. rugulipennis*.

plan. Dans la figure 62, j'ai regroupé sur la base du spicule les espèces *L. gemellatus*, *L. italicus* et *L. maritimus* ainsi que *L. pratensis*, *L. punctatus* et *L. wagneri*, les espèces américaines et *L. rugulipennis* sont mises à part car ils se différenciaient correctement dans les arbres phylogénétiques.

4-2. Analyse du contour

En me basant sur l'affirmation qu'il existe une différence au niveau du pronotum pour différencier certaines espèces (voir paragraphe 7 du contexte général), j'ai isolé les pronotums au niveau des photos pour pouvoir réaliser une analyse de contour de cet organe. L'analyse de contour effectuée avec le package « Momocs » sous R révèle deux groupes distincts par une valeur propre de 88% environ (Figure 63). A l'examen, il est apparu que les espèces étudiées étaient en mélange dans ces deux groupes. J'ai donc rattaché à chaque point l'individu correspondant et cherché ce qui pouvait être à l'origine de cette séparation et qui pouvait expliquer une différence aussi nette. Le résultat le plus probant est que cela corresponde en fait à la date de récolte et donc à la génération de l'été (sortie de l'hiver) ou d'automne des *Lygus*. Ainsi, sur la figure 63, les insectes sortant de la diapause hivernale (été) sont à gauche (groupe A) et ceux de l'automne sont à droite (groupe B).

placement de mes points et donc l'impact que cela pourrait engendrer dans mon taux d'erreur. Dans la première figure (Figure 61), toutes les espèces sont représentées. L'axe horizontal représente de gauche à droite la variation de la tête de large à étroite et l'axe vertical représente de haut en bas à la variation de la taille du corps d'étroite à large. La répartition des échantillons semble très aléatoire et aucune espèce n'apparaît clairement séparée des autres dans le



Figure 63 : Graphe représentant la disparité de la morphologie du pronotum en fonction des différentes espèces (gris = *L. pratensis*, noir = *L. maritimus*, rouge = *L. gemellatus*, jaune = *L. rugulipennis*, bleu = *L. punctatus*, rose = *L. italicus*).

J'ai ensuite tenté de voir s'il existait des différences entre mes espèces à l'intérieur de chaque génération

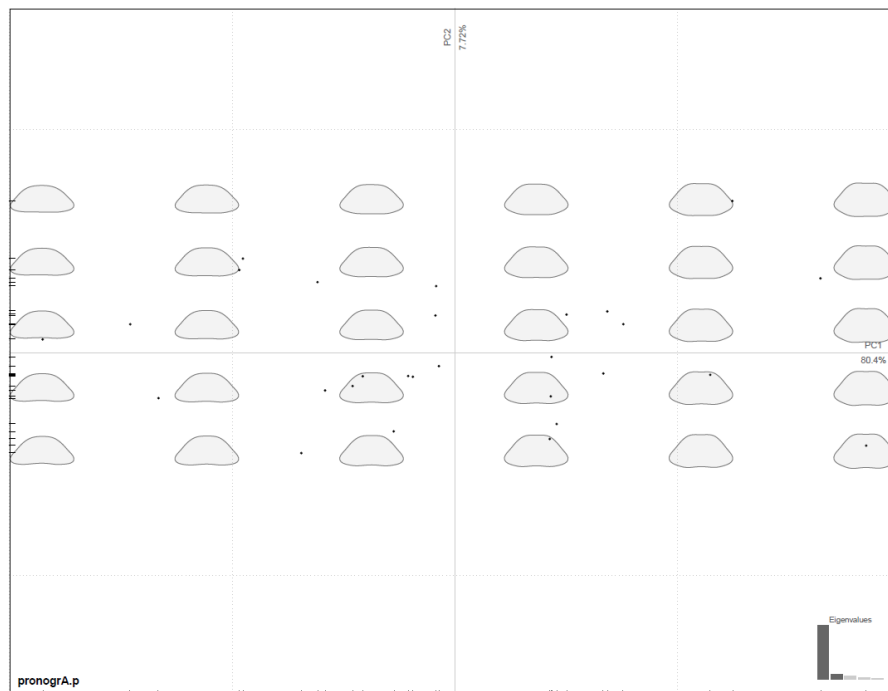


Figure 64 : Graphe représentant la distribution de la morphologie de contour dans le groupe A : insectes sortant de diapause.

c'est-à-dire est-il possible de différencier les espèces par la forme du pronotum au sein des groupes A (insectes sortant de la diapause hivernale) et B (insectes de la génération de l'année, sortis en l'automne). Dans les figures 64 et 65, les espèces sont réparties aléatoirement et aucun groupe n'apparaît

clairement défini,

aucune différenciation n'est observée et aucune distinction d'espèce n'est relevée dans chacun des deux groupes.

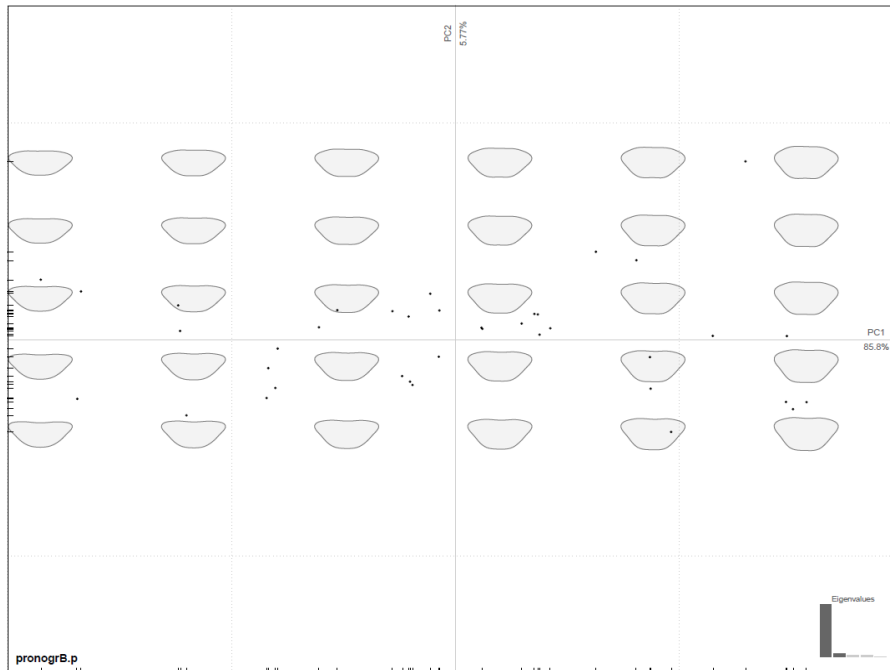


Figure 65 : Graphe représentant la distribution des morphologies de contour des espèces du groupe B (insectes de la génération de "l'année" en cours).

Une analyse sur le contour comprenant le pronotum et les hémélytres n'a pas apporté plus de résultats que ceux que j'ai obtenu avec le pronotum seul.

5- Conclusion

En conclusion des études morphométriques et moléculaires, on peut constater qu'il existe peu de différences entre les espèces actuellement reconnues au sein du genre *Lygus* et ce aussi bien pour les espèces européennes que pour les espèces américaines étudiées.

Sur la base de la morphologie, même si les caractères restent peu fiables, on peut néanmoins regrouper des espèces ayant un spicule long, spatulé et pourvu de spinules (*L. pratensis*, *punctatus*, *wagneri*) et celles ayant un spicule court terminé en pointe (*L. gemellatus*, *maritimus*, *italicus*). *Lygus rugulipennis* forme un groupe à part car les individus possèdent une pilosité et une ponctuation plus forte sur les hémélytres et leur spicule est court, en pointe et pourvu de spinules. La morphométrie géométrique quant à elle a mis en évidence des variations saisonnières qui concernent toutes les espèces. Il n'existe aucune différence entre les supposées espèces, aucune différence biogéographique non plus n'a été mise en évidence sur la base des échantillons testés. Les analyses moléculaires séparent assez clairement *L. rugulipennis* des autres espèces européennes. Les 6 autres espèces forment des clades qui varient d'un gène à l'autre et qui sont mal supportés. Aucun des gènes testés ne permet de distinguer les différentes espèces. Les *L. punctatus* du Mercantour se placent de manière constante dans le même groupe que *L. rugulipennis* au sein des espèces américaines alors que d'autres individus de *L. punctatus* sont regroupés avec *L. pratensis* comme on s'y attendait à partir des caractères morphologiques. Enfin quelques individus très difficiles à identifier morphologiquement ne montrent pas non plus de position phylogénétique fixe selon les gènes étudiés.

L'analyse RADseq confirme que l'ensemble des espèces diffèrent très peu voire pas du tout les unes des autres. L'analyse ne permet pas de former des clades nets indépendamment du nom qu'on pourrait leur donner.

D/ Interprétation et Discussion

1- Identifications à l'aveugle et morphométrie

Pour valider le développement d'une méthode ou d'une technique d'identification standard sur une espèce, l'OEPP (Organisation Européenne et méditerranéenne pour la Protection des Plantes) a publié un guide méthodologique à destination des laboratoires d'analyse (PM 7/98, bulletin OEPP). Il n'est cependant pas d'usage en taxinomie de valider statistiquement les clés d'identification, chaque auteur fournit la sienne en se fiant à son expertise. Les essais de validation sont plutôt l'exception que la règle. Balmès et Mouttet (2017) l'ont fait pour des larves de Tephritidae. Mon travail est sans doute le premier qui évalue la clé d'identification des espèces européennes de *Lygus*. Au vu des résultats des identifications à l'aveugle effectuées, il est impossible de dire que la clé d'identification actuelle qui sert à tous les entomologistes est fiable. L'absence de concordance entre les déterminations d'utilisateurs différents ou entre déterminations successives d'un même utilisateur est révélatrice. En effet, le résultat donnant 45% d'identification correcte par rapport à l'identification attendue l'illustre bien (Tableau 12). En aucune manière la clé de détermination répond aux critères demandés pour obtenir une quelconque accréditation de diagnostic (PM 7/98, bulletin OEPP). Cela démontre également la nécessité de notre étude dont l'objectif est de trouver une méthode de caractérisation et d'identification spécifique fiable pour ce genre.

J'ai discuté les critères morphologiques utilisés pour identifier mes espèces précédemment (pages 83-89) mais de nombreux auteurs ont souligné qu'ils étaient difficiles à utiliser et subjectifs (Leston, 1952 ; Southwood et Leston, 1959 ; Schwartz et Footitt, 1998 ; Aglyamyanov, 2006 etc.). Basés essentiellement sur la couleur, la ponctuation et la pilosité, ces caractères sont sujets à une très grande variabilité intraspécifique accentuée par le fait qu'ils varient d'une génération à l'autre sous l'effet notamment de la température (Kullenberg, 1944 ; Fye, 1982 ; Aglyamzyanov, 1986, 1987b, 1990b ; Demchenko, 2004 etc.).

Pour éviter cet écueil j'ai ajouté à mon test à l'aveugle l'utilisation de la forme du spicule du pénis que la plupart des auteurs (Wagner et Weber, 1964 ; Aglyamzyanov, 2006 notamment) illustrent et considèrent comme un critère fiable de reconnaissance en dépit d'une variabilité intraspécifique déjà rapportée (Cobben, 1958 ; Aglyamzyanov, 2006). Bien qu'ayant placé mes testeurs dans les meilleures conditions possibles (spécimens en bon état, matériel optique performant, uniquement des mâles disséqués), la clé de la Faune de France (Wagner et Weber, 1964) associée à l'observation du spicule du pénis n'ont pas permis une identification fiable ni reproductible. Les autres clés n'apportent rien de plus dans la mesure où elles sont essentiellement basées sur les mêmes caractères. Les critères

morphologiques existants ne permettent donc pas une identification des sept espèces de *Lygus* européens. La fiabilité de l'identification et sa reproductibilité s'améliorent considérablement si on se limite à la délimitation de groupes d'espèces définis comme suit : *L. rugulipennis* ; *L. pratensis/L. wagneri/L. punctatus* ; *L. gemellatus/L. maritimus/L. italicus*. Il est possible en associant des critères de pilosité, ponctuation et de forme du spicule d'identifier en routine avec une certaine fiabilité (supérieure à 80% dans les tests que j'ai menés) ces espèces ou groupes d'espèces.

Plusieurs auteurs observent des différences spécifiques au niveau de la forme du pronotum notamment (Wagner, 1971 ; Schwartz et Footitt, 1998). J'ai donc essayé de trouver d'autres critères d'identification en utilisant des méthodes de morphométrie (analyse des points homologues et du contour). Bien qu'Aglyamzyanov (2006) affirme qu'il existe un dimorphisme sexuel plus ou moins prononcé au niveau de la taille dans de nombreuses espèces, ce dimorphisme n'est pas révélé dans mes études de morphométrie. Je n'ai pas réussi non plus à mettre en évidence les espèces ni les groupes d'espèces avec ces méthodes qui sont pourtant reconnues pour leur puissance de discrimination (Zuniga-Reinoso et Benitez, 2015). Seul le changement de forme du pronotum entre la génération sortant de l'hiver (forme estivale dans les publications) et celle de l'été (forme automnale dans les publications) a été montré dans mon étude de morphométrie géométrique sur le contour du pronotum. Ce changement peut être dû à des différences de températures mais je n'ai pas fait d'analyse pour le confirmer ou l'infirmer. Des changements de couleur ou de ponctuation d'une génération à l'autre ont été déjà signalés, notamment en lien avec la température (Aglyamzyanov, 2006), et plusieurs articles sur les espèces américaines corroborent cet état de fait (Snodgrass et al, 2012 ; Spurgeon et Brent, 2019). À ma connaissance, aucune publication, à ce jour, ne montre cette différence de forme du pronotum entre les générations. Ce résultat vient renforcer le constat qu'une partie des différences morphologiques utilisées pour distinguer les espèces européennes de *Lygus* sont en fait dues aux conditions environnementales ou liées aux générations. Un nombre important de « formes », « sous-espèces » voire « espèces » a été décrit sur ces mauvaises bases et éventuellement mises en synonymie par la suite (*L. gemellatus f. adpersus* (Schilling, 1837) repris par Wagner (1947) comme *L. gemellatus f. autumnalis*, élevée au rang d'espèce puis remise en synonymie par exemple.

2- Résultats moléculaires

Barcoding, phylogénies et RAD

Des résultats convaincants ont ainsi été obtenus en couplant plusieurs gènes ou plusieurs techniques pour plusieurs groupes d'hyménoptères (Al Khatib et al., 2014, 2016 ; Gebiola et al., 2017 ; Mottern et Heraty, 2014 ; Rugman-Jones et al., 2009). Dans ma démarche de taxinomie intégrative j'ai donc réalisé plusieurs études de biologie moléculaire (séquençage de plusieurs gènes mitochondriaux et nucléaires) de manière à voir si les sept espèces européennes de *Lygus*, très mal caractérisées morphologiquement, pouvaient être distinguées de façon plus fiables d'un point de vue moléculaire.

Des distances génétiques faibles.

Le premier constat est que les distances génétiques au sein du genre *Lygus* sont très faibles (de l'ordre de 0.3% à 5% pour les espèces européennes et holarctiques). C'est le cas entre les espèces européennes mais aussi entre les espèces américaines que j'ai étudiées et entre les espèces de ces deux continents. Les arbres phylogénétiques obtenus et ce quel que soit le gène ou les concaténations de gènes donnent donc des clades peu différenciés, mal soutenus et qui changent suivant les marqueurs. Il existe tout de même des clades bien soutenus comme *L. rugulipennis*, *L. vanduzeei*, *L. lineolaris*.

Les distances calculées entre les outgroups appartenant aux genres *Apolygus* et *Orthops* et les différentes espèces de *Lygus* font partie des rares valeurs significatives, l'identification générique étant garantie par J.-C. Streito et non entachée d'erreur. Cette distance pour le gène COI entre genres phylogénétiquement proches varie de 11,1% entre *Orthops* et *L. lineolaris* et 13,1% avec *L. pratensis*. Ces valeurs sont un peu plus élevées pour *Apolygus* (de 12,2% avec *L. elisus* à 14,1% avec plusieurs *Lygus* européens : *L. gemellatus*, *L. pratensis* etc.). L'ordre de grandeur est conforme à ce que l'on attendait compte tenu de l'expérience que nous avons acquise dans le code-barres des hétéroptères (Streito et al., 2018) et des références bibliographiques disponibles (Raupach et al., 2014).

Les distances entre espèces de *Lygus* sont quant à elles à interpréter avec beaucoup plus de précautions bien qu'il soit toutefois possible de le faire avec une certaine confiance pour quelques espèces. Pour le gène COI on peut par exemple comparer *L. rugulipennis* (dont l'identification semble relativement fiable) avec *L. italicus* (seule espèce facile à reconnaître grâce à son tylus noir même si c'est encore un critère subjectif qui peut donc être mis en doute). La distance moyenne obtenue entre ces deux espèces est de 5,7%. Certains hétéroptères présentent des distances interspécifiques plus élevées entre 8,1 et 14,2% pour les *Carpocoris* (Lupoli et al., 2013) par exemple. La distance est d'ailleurs à peu près la même entre *L. rugulipennis* et toutes les espèces de *Lygus* européennes à l'exception des populations de *L. punctatus* du Mercantour sur lesquelles je reviendrai. Avec les deux gènes mitochondriaux (Cytb et ND5), la distance est un peu plus élevée et aux alentours de 7-8% entre *L. rugulipennis* et les autres espèces européennes de *Lygus* à l'exception toujours des *L. punctatus* du Mercantour qui sont plus proches. Le 28S est beaucoup moins variable entre ces espèces de *Lygus* (0,3% entre *L. rugulipennis* et *L. italicus*) et pour les ITS les distances sont de l'ordre de 2 à 3% entre les groupes déjà définis. Avec le COI nous avons une distance proche de zéro entre des espèces appartenant au même groupe morphologique et phylogénétique. Ainsi les distances entre *L. gemellatus*, *L. maritimus* et *L. italicus* est de 0% avec le COI, au maximum de 3,4% avec le Cytb et de 0,3% avec le 28S. Entre *L. pratensis* et *L. gemellatus* que l'on sépare assez bien par la taille du spicule on observe une distance de 0,5% sur le COI, 2,5% sur le Cytb et 0,3% sur le 28S. Ce sont des distances très faibles.

Concernant les espèces nord-américaines, qui sont plus tranchées morphologiquement que les européennes, on observe des valeurs supérieures mais néanmoins pas très élevées allant de 1,6% entre *L. elisus* et *L. bradleyi* à 5,2% pour *L. vanduzeei* et *L. bradleyi*. À noter que *L. rugulipennis* montre des

distances génétiques plus faibles par rapport aux espèces américaines qu'avec les espèces européennes. Pour l'ensemble des gènes ainsi que pour les différentes concaténations, il existe donc une faible différence entre les espèces : maximum de 2% avec le *cytb* (et valeur inférieure pour les autres gènes) entre *L. gemellatus*, *L. italicus* et *L. maritimus* mais aussi entre *L. pratensis*, *L. wagneri* et une partie de *L. punctatus*. Les variations de séquences entre individus au sein de chaque espèce fluctuent très peu et ce, malgré le fait que des erreurs d'identification soient possibles et que pour certaines espèces l'échantillonnage soit assez étendu. Seul *Lygus punctatus* a une variabilité intra-spécifique plus importante qui s'explique sans doute par le fait que nous avons dû mélanger plusieurs taxons sous ce nom. En effet, certains « *L. punctatus* » collectés dans le Parc National du Mercantour se placent sur nos arbres avec les espèces nord-américaines + *L. rugulipennis* alors que tous les autres individus sont groupés avec les espèces européennes et notamment *L. pratensis* et *L. wagneri*.

Les distances génétiques que nous avons obtenues, malgré les erreurs liées aux identifications peu fiables, nous montrent que :

- le *Cytb* est parmi les gènes testés celui qui met en évidence les plus grandes distances entre les espèces et le 28S les plus faibles. Le COI est intermédiaire tout comme ND5 et ITS qui n'apportent rien de plus.
- *Lygus rugulipennis* (qui se groupe avec certaines populations de *L. punctatus* du Mercantour) est bien différente des autres espèces européennes,
- les distances génétiques entre les espèces européennes *L. gemellatus/maritimus/italicus/pratensis/wagneri* sont très faibles et ce quel que soit le gène testé. Elles sont encore plus faibles si on se place à l'intérieur des groupes morphologiques *L. gemellatus/maritimus/italicus* et *L. pratensis/wagneri*.
- *Lygus punctatus* est impossible à caractériser correctement dans la mesure où on pense avoir réuni sous ce nom différents taxons,
- enfin malgré les erreurs probables d'identification, la variabilité intraspécifique semble être faible.

Les analyses phylogénétiques ne permettent pas de différencier les espèces de *Lygus* européennes.

Quelles que soit les analyses, phylogénétiques ou les réseaux haplotypiques, *L. rugulipennis* se regroupe avec les espèces américaines et certaines populations de *L. punctatus* du Mercantour en un ensemble relativement constant et bien soutenu, séparé des autres espèces européennes. *Lygus vanduzeei* (espèce américaine) a une position ambiguë qui change un peu d'un gène à l'autre mais qui semble être intermédiaire entre *L. rugulipennis* et les espèces européennes. Deux espèces américaines sont relativement bien caractérisées génétiquement (*L. vanduzeei* et *L. lineolaris*), par contre *L. elisus* et *L. bradleyi* ne se séparent pas l'une de l'autre sauf lors de la concaténation de l'ensemble des gènes.

Les espèces européennes se groupent donc ensemble à part des espèces américaines + holarctiques (*L. rugulipennis* et *L. punctatus* en partie). Elles se distribuent en 2 groupes plus ou moins distincts mais en général peu soutenus en fonction des gènes étudiés. Les individus de *L. gemellatus*, *L. italicus* et *L. maritimus* sont souvent rassemblés dans un groupe et les échantillons de *L. pratensis*, *L. wagneri* et *L. punctatus* se rassemblent dans un autre bloc. On retrouve grossièrement, même si les distances

génétiques sont très faibles et les clades très peu soutenus, ce que l'on observe en morphologie, à savoir le groupe avec un spicule court et fin (*gemellatus/maritimus/italicus*) et le groupe avec un spicule long en forme de massue à l'apex (*pratensis/punctatus/wagneri*). Par contre au sein de chaque groupe aucun des marqueurs testés ne permet de séparer correctement les différentes espèces supposées.

Dans les reconstructions phylogénétiques en maximum de vraisemblance, le biais le plus important que l'on puisse avoir est l'attraction des longues branches. En effet, deux taxons présentant des branches terminales beaucoup plus longues que celles de leurs plus proches parents seront attirés l'un vers l'autre. Pour mes études les seules longues branches existantes sont celles des outgroups. Le fait d'avoir des valeurs de bootstrap faible pour définir les groupes pour l'ensemble de mes gènes n'est pas le fait d'un échantillonnage de gènes trop faible car justement, ce fait se retrouve pour tous les gènes et pour les mêmes groupes d'espèces. La topologie de l'arbre indique l'ordre dans lequel les divergences successives des lignées menant aux espèces actuelles se sont produites au cours du temps. Les longueurs de branches modélisent l'aspect quantitatif de l'évolution moléculaire : la longueur d'une branche, mesurée en nombre moyen de changements par site, correspond au produit du temps écoulé entre deux événements de spéciation par la vitesse d'évolution de la séquence dans cette lignée. Tous les arbres reconstruits ont à peu près la même topologie quel que soit le gène étudié et seules les valeurs de bootstrap varient. On peut par conséquent exclure la possibilité d'attraction de longues branches dans les arbres phylogénétiques que nous avons obtenus.

Certains individus ont une position qui varie suivant les gènes testés.

Trois spécimens se comportent de manière singulière dans mes études : JSTR00329_0801 (identifié morphologiquement comme *L. gemellatus*), JSTR03797_0101 (*Lygus* sp.) et JSTR05209_0101 (*L. gemellatus*). Ces trois spécimens changent de clade d'un gène à l'autre, passant des groupes d'espèces « européennes » aux groupes d'espèces « américaines » ce qui indique que la place de ces individus n'est pas définie. Morphologiquement JSTR03797_0101 se rapproche de *L. rugulipennis* alors que les deux autres de *L. gemellatus*. Ce comportement pourrait s'expliquer par des événements d'hybridation entre *L. gemellatus* et *L. rugulipennis*, donc entre des individus appartenant aux deux groupes d'espèces les plus supportés ! Cette hypothèse reste néanmoins à être étayée par des données supplémentaires (comme des études de croisement).

Apports du RADSeq

Les approches RADseq sont moins sensibles au tri incomplet des lignées et à l'introgession des méthodes multigéniques traditionnelles (Andrews et al., 2016). Cette méthode est idéale pour détecter les différences au niveau des populations et des espèces et s'est révélée prometteuse pour les études sur la spéciation écologique des insectes herbivores (Bagley et al., 2017 ; Egan et al., 2015). Une publication de Zhang et al. (2018) a montré que le faible nombre de SNPs récupérés chez les 3 espèces de *Lygus* étudiées (espèces américaines : *L. keltoni*, *L. borealis* et *L. elisus*) était probablement dû à la

faible quantité d'ADN ou à la dégradation due au parasitisme de *Peristenus* mais ce faible nombre de SNP a tout de même permis de bien différencier ces trois espèces. Il est évident que les facteurs quantité et dégradation d'ADN sont à prendre en compte dans toutes les études de RADseq. Par comparaison, mon étude utilise beaucoup plus de SNP (2249 loci) mais n'arrive à différencier correctement que le groupe des espèces américaines par rapport aux espèces européennes.

En général, la technique RADseq est utilisée pour délimiter des espèces cryptiques (Perry et al., 2018 ; Cruaud et al., 2014). Chez deux espèces cryptiques de papillons (les teignes des crucifères *Plutella* ; Perry et al., 2018) qui ne présentent pas beaucoup de diversité au niveau mitochondrial, le RADSeq a pu montrer qu'il était possible de les différencier. Malgré les distributions sympatriques et la capacité d'hybridation, il existe une forte divergence génomique et phénotypique entre ces deux espèces de *Plutella*, ce qui résulte d'histoires de colonisation différentes et d'un isolement reproductif après un contact secondaire.

L'étude des RAD conforte les résultats obtenus précédemment à savoir que les espèces de *Lygus* sont peu différenciées entre elles. Nous avons choisi de faire une banque RADseq de manière à trouver des SNPs permettant de différencier les différentes espèces entre elles mais pour les *Lygus*, le RADseq n'a pas amélioré leur caractérisation. Le pourcentage de sites variables est de 5% dans notre étude alors que pour différencier les carabes, il est de l'ordre de 9.6% dans le genre *Chrysocarabus* et de 16.3% dans le genre *Carabus* (Cruaud et al., 2014). De même, le pourcentage de sites informatif est très faible chez *Lygus* (1% versus 4% et 5.8% dans les deux genres de carabes précités, Cruaud et al., 2014). Dans notre étude, il manque deux espèces importantes qui sont *L. rugulipennis* et *L. pratensis* pour lesquelles je n'ai pas obtenu de séquences exploitables. L'arbre construit à partir du RADseq est assez proche des phylogénies obtenues plus classiquement mais il est difficile d'approfondir davantage l'analyse pour le moment. Les espèces américaines sont séparées des espèces européennes et cette séparation est soutenue à 49% ce qui est peu robuste. Dans les espèces européennes, le clade formé par *L. gemellatus*, *L. maritimus* et *L. italicus* est soutenu également à 49% mais à l'intérieur du clade, les nœuds sont très bien soutenus (BP =99 et PB = 100). Ensuite, il existe le groupe formé par l'échantillon de *L. wagneri* et l'individu de *L. punctatus* qui peut être remis en cause car le pourcentage d'indéterminations est élevé pour ce dernier et donc le nœud peut ne pas être considéré comme fiable.

Analyse des réseaux d'haplotypes.

Dans l'étude de Roerhdanz et al. (2015) sur le gène 28S des espèces de *Lygus* américaines, quatre haplotypes généraux ont été trouvés. Quand on regarde les résultats de mon étude, le même fragment analysé me donne cinq haplotypes pour les 7 espèces européennes étudiées et les haplotypes américains et européens sont les mêmes pour deux d'entre eux. Roerhdanz et al. (2015) explique les différences d'haplotype des espèces américaines par des hybridations, ce qui impliquerait que les espèces étudiées subiraient également des hybridations.

Zhou et al. (2012) en travaillant sur *L. hesperus*, révèlent qu'en dépit d'une grande variabilité de couleur et d'une grande diversité d'habitats occupés par les populations, il n'existe aucune structuration génétique significative de ces populations.

Conséquences sur la taxinomie du genre *Lygus* en Europe et nécessité de changement nomenclaturaux.

A l'examen de mes résultats il apparaît clairement qu'un certain nombre d'espèces de *Lygus* ne sont soutenues ni morphologiquement ni génétiquement. J'ai inclus des espèces américaines dans mon jeu de données pour essayer d'appréhender le genre dans son ensemble et mieux comprendre sa structuration. Je ne les connais cependant pas suffisamment et n'ai pas un échantillonnage adéquat pour discuter de leur statut. Je me bornerai donc à discuter des changements nomenclaturaux souhaitables pour les espèces européennes. Des synonymies formelles seront proposées ultérieurement dans un article scientifique qui sera proposé à une revue de taxinomie comme le prévoit l'article 8 du titre 3 du Code International de Nomenclature Zoologique (4^e édition, 1999, sur iczn.org le site de la Commission internationale de nomenclature zoologique).

« Groupe » *Lygus pratensis* / *L. wagneri* / *L. punctatus*

Morphologiquement, on différencie *L. pratensis* de *L. wagneri* uniquement sur des critères de coloration et plus spécialement par la présence d'un W sur le scutellum de certains individus dans les populations de *L. wagneri*. Tous les autres caractères sont inconstants et notamment la forme du spicule. En pratique on nomme *L. wagneri* les populations d'altitude contenant des individus avec un W sur le scutellum et une ponctuation plutôt dense et régulière et *L. punctatus* ces mêmes populations d'altitude avec des W lorsqu'on estime que la ponctuation est moins dense et moins régulière. Nous avons vu que la présence ou pas d'un W sur le scutellum faisait partie des caractères de coloration influencés par la température/génération. Le fait que nos populations d'altitude, où il fait plus froid, aient parfois un W sur le scutellum n'a donc rien de surprenant et ce critère n'a donc probablement aucune signification taxonomique. J'ai pu démontrer qu'à l'aveugle et sans connaître l'altitude d'origine du spécimen, ces critères (W sur le scutellum et ponctuation hémélytrale en particulier) ne permettent aucune discrimination entre ces trois taxons. Mes analyses génétiques donnent le même résultat, sur les 5 gènes testés aucun ne permet de séparer ces taxons. Dans ces conditions je proposerai la synonymie suivante dans un futur article et en concordance avec le code international de la nomenclature zoologique :

Lygus pratensis (Linnaeus, 1758)448 : = *Lygus wagneri* Remane, 1955 : 115.

Dans ce groupe d'espèces, je considère les individus que j'ai nommés *L. punctatus* comme des erreurs d'identification. Je discuterai plus loin du statut taxonomique de *L. punctatus* (Zetterstedt, 1838), connu également en Amérique du Nord, en même temps que *L. rugulipennis*.

Lygus pratensis est donc caractérisé morphologiquement par le spicule de son pénis qui est de grande taille et terminé en spatule munie de spinules. Il est génétiquement très voisin de *L. gemellatus* dont on ne le différencie pas de manière fiable par code-barres.

« Groupe » *Lygus gemellatus* / *L. maritimus* / *L. italicus*

Morphologiquement on ne différencie *L. gemellatus* de *L. maritimus* que sur la base de critères de coloration mais les tests d'identification à l'aveugle ont montré qu'il n'était pas possible de différencier ces taxons sur cette base. En pratique, on nomme les populations de bord de mer dont les taches de coloration brunes sont en moyenne moins contrastées *L. maritimus* et les autres populations *L. gemellatus*. Nous avons vu que les taxonomistes anglais (Southwood et Leston, 1959) considèrent que seul *L. maritimus* est présent en Angleterre, même à l'intérieur des terres. Compte tenu des variations saisonnières de coloration déjà évoquées dans le genre *Lygus* je considère que ces critères de couleur n'ont aucune signification taxonomique. Par ailleurs, mes études génétiques n'ont mis en évidence aucune différence entre ces deux taxons et ce, sur 5 gènes. Dans ces conditions je proposerai la synonymie suivante dans un futur article et en concordance avec le code international de la nomenclature zoologique :

Lygus gemellatus (Herrich-Schäffer, 1835) : 51, 84 = *Lygus maritimus* Wagner, 1949 : 37.

Le cas du taxon *L. italicus* Wagner, 1950 est moins simple. Morphologiquement il est identique en tout point à *L. gemellatus* (= *L. maritimus*) mais il s'en différencie par une tache noire en général très visible sur le tylus que n'ont pas les spécimens identifiés comme *L. gemellatus*. Il s'agit encore d'un critère de coloration dont l'intérêt taxonomique pourrait être discuté mais qui cette fois est tranché et pourrait correspondre à une variation géographique. Génétiquement il se différencie très peu de *L. gemellatus* (= *L. maritimus*). Toutefois, les deux échantillons de *L. italicus* se regroupent sans problème lors de l'étude RADseq et avec un nœud soutenu à 100%. Établir une synonymie est tentant mais demande de mieux connaître la répartition précise de ce taxon par rapport à *L. gemellatus*.

D'après Kerzhner et Josifov (1999), *L. italicus* est connu des pays suivants : Bulgarie, Croatie, France, Grèce, Italie, Espagne et Algérie ; *L. gemellatus* (= *L. maritimus*) est très largement répandu dans toute la région paléarctique et aussi dans les pays suivants : Bulgarie, Croatie, France, Grèce, Italie, Espagne et Algérie. On pourrait penser que ces deux entités sont donc sympatriques et la synonymie serait logique. Toutefois les données de répartition que je viens de donner sont peu précises et peuvent cacher des réalités biogéographiques différentes. Par exemple concernant la France pour laquelle je dispose de données de répartitions plus fines, *L. italicus* est présent quasiment uniquement en Corse où jusqu'à preuve du contraire *L. gemellatus* n'a pas été observé. Sur le continent, mis à part une donnée dans l'Aude, seul *L. gemellatus* a été collecté et ce très abondamment. Il serait nécessaire comme je l'ai fait pour la France de vérifier les localités précises de ces deux entités mais ces données ne sont pas accessibles et il serait nécessaire de consulter un grand nombre de collections, ce que je n'ai pas pu faire

dans le cadre de ce travail. Dans ce contexte plutôt que de mettre ces deux taxons en synonymie, je propose un statut de deux sous-espèces, la nominale (*L. gemellatus gemellatus*) et *L. gemellatus italicus*, comme hypothèse de travail à tester en vérifiant si les aires de répartitions de ces taxons sont effectivement disjointes.

Lygus gemellatus se caractérise morphologiquement des autres espèces européennes de *Lygus* par son spicule de taille relativement petite dont l'extrémité apicale est effilée (non spatulée) et dépourvue de spinules ; par sa ponctuation hémélytrale moins dense et laissant des plages lisses ainsi que par une pilosité courte et peu fournie ; son tylus est concolore. *Lygus italicus* est identique mais avec une tache noire sur le tylus. Par contre, le code-barres ne permet pas de différencier *L. gemellatus*, *L. italicus* et *L. pratensis* de manière fiable.

Compte tenu des résultats moléculaires on pourrait être tenté de réunir *L. gemellatus*, *L. italicus* et *L. pratensis* sous un même nom. Toutefois on peut différencier ces trois entités de manière relativement fiables par des caractères morphologiques (forme du spicule et coloration du tylus) et je les conserve pour le moment.

Cas de *Lygus rugulipennis*

Lygus rugulipennis est une espèce holarctique que l'on distingue assez bien morphologiquement des autres *Lygus* européens : il est pourvu d'une pilosité dense et longue caractéristique ; d'une ponctuation dense ; d'un spicule petit à apex effilé et avec quelques spinules. C'est la seule espèce que l'on arrive à identifier avec une bonne fiabilité, du moins en Europe. Génétiquement *L. rugulipennis* a une position stable (groupe frère de *L. bradleyi* et de *L. elisus*) au sein des espèces américaines que nous avons étudiées. Il se différencie en barcoding des autres espèces européennes (*L. gemellatus*, *L. pratensis* et *L. italicus*) avec une distance génétique de 5% environ. Il existe toutefois des spécimens (peut-être des hybrides entre *L. rugulipennis* et *L. gemellatus*) dont les identifications morphologiques et moléculaires sont contradictoires. Il se différencie morphologiquement des populations de *L. punctatus* du Mercantour (dont je discuterai le statut plus loin) sur la base de son spicule, de sa pilosité et de sa ponctuation. Par contre il est impossible de distinguer ces deux espèces par code-barres. D'autres gènes (ND5, ITS), semblent séparer les deux entités mais mon échantillonnage ne comporte que trois spécimens de *L. punctatus* du Mercantour et ce résultat devra être confirmé sur un nombre plus grand de spécimens provenant de plus de localités.

Même s'il existe probablement des hybridations entre *L. rugulipennis* et les autres espèces européennes il ne paraît pas justifié compte tenu des caractères morphologiques discriminants et de la distance génétique de remettre en cause le statut taxonomique de ce taxon.

Cas de « *L. punctatus* »

Les spécimens identifiés morphologiquement comme *L. punctatus* se scindent en deux groupes très distincts : une partie se regroupe avec les espèces européennes (*L. pratensis* = *L. wagneri*), les autres

(trois spécimens de deux localités du Mercantour) avec les espèces américaines et notamment *L. rugulipennis*. La première explication possible est une erreur d'identification morphologique. *Lygus punctatus* est l'espèce la plus délicate à caractériser morphologiquement notamment par rapport à *L. pratensis* (= *L. wagneri*) dont elle partage le même spicule. Elle diffère par contre très nettement de *L. rugulipennis* notamment par son spicule mais aussi la pilosité courte et éparse et une ponctuation beaucoup moins dense. Compte tenu de la proximité morphologique, il est facile de concevoir que les individus qui se regroupent avec *L. pratensis* (= *L. wagneri*) ont donc été mal identifiés car ils ne diffèrent en rien des individus de *L. pratensis*. Il existe donc un groupe homogène morphologiquement et sans différenciation génétique comme je l'ai dit précédemment.

Les spécimens du Mercantour qui se regroupent avec *L. rugulipennis* posent davantage de questions. Suivant les gènes ces trois individus sont parfois séparés (28S avec BP = 69 ; ITS avec BP = 77) parfois regroupés (cytb et ND5, BP inférieur à 60) avec *L. rugulipennis* ; quoiqu'il en soit la distance génétique entre eux est très faible (de l'ordre de 0 à 0,02%). Morphologiquement ces individus attribués à *L. punctatus* correspondent bien aux critères donnés pour cette espèce et en tout cas diffèrent de manière nette de *L. rugulipennis*. Contrairement aux individus supposés hybrides de *gemellatus/rugulipennis* qui changent de clades suivant les gènes, la position de ces *L. punctatus* est stable car les concaténations montrent une séparation d'avec *L. rugulipennis* et sont proches des espèces américaines. Plusieurs hypothèses sont envisageables. La première serait, comme pour *L. gemellatus*, une hybridation entre *L. rugulipennis* et les spécimens du groupe *L. pratensis* (= *L. wagneri*) mais ce groupe d'individus « *punctatus* » ne se retrouve jamais dans les clades européens. La seconde hypothèse serait une origine américaine de cette population du Mercantour due à une introduction accidentelle en lien avec la route du textile. En effet nombre de personnes du Mercantour sont partis au Mexique pour faire fortune au moment de l'avènement du textile au milieu du XIX^{ème} siècle (Paredes, 2006). La ville de Barcelonnette est connue pour cette migration de personnes ayant fait fortune dans le Nouveau Monde avec la vente de la soie ou du textile et qui sont ensuite revenus au pays. Il est possible que ces personnes ayant fait des allers-retours aient aussi transporté dans leurs bagages des spécimens de *Lygus* au retour. Enfin, *L. punctatus* a été décrit à partir d'un spécimen mâle dont la localité type est en Suède (Lycksele, Västerbotten en Laponie). Si ces populations nordiques étaient proches génétiquement des populations américaines et de celles du Mercantour, cela pourrait signifier que les Alpes constitueraient un refuge interglaciaire de ce taxon dans le Sud de l'Europe. Dans ce cas nous devrions avoir des populations de *L. punctatus* génétiquement proches de *L. rugulipennis* dans les régions froides de l'Europe et toutes les autres populations comme celles méditerranéennes devraient se rapporter à *L. pratensis* et donc être de simples erreurs d'identifications morphologiques. Pour confirmer ou infirmer ces hypothèses, le présent échantillonnage est ici très insuffisant. Il faudrait d'abord comparer les séquences de *L. punctatus* du Mercantour avec des *L. punctatus* du continent américain, or nous n'en avons pas et aucune séquence n'est disponible dans les bases de données internationales. Ensuite, il faudrait également accroître l'échantillonnage dans toute l'aire géographique de *L. punctatus* afin de réaliser une véritable étude

phylogéographique de l'espèce pour voir si la population du Mercantour est isolée ou si on retrouve des *L. punctatus* qui lui sont proches génétiquement ailleurs en Europe notamment en Laponie.

Conséquences de mes études sur l'identification des *Lygus* dans un cadre agronomique.

Le but de notre étude était de trouver des outils fiables pour caractériser des espèces de *Lygus* présentes dans des cultures françaises et qui ont un impact sur la santé des plantes. Mon travail permet de faire des hypothèses d'un point de vue taxonomique en fournissant des éléments pour supprimer deux espèces sans fondement taxonomique et confirmer la possibilité de distinguer morphologiquement 3 groupes d'espèces : « *L. rugulipennis* », « *L. pratensis* » et « *L. gemellatus* ». Toutefois à la vue des résultats, il n'est pas possible de proposer un marqueur moléculaire qui permette de séparer ces 3 groupes. Je peux toutefois proposer la combinaison d'un outil morphologique (la forme du spicule et la pilosité des hémélytres) et un outil moléculaire (le code-barres) qui permettent d'améliorer l'identification et donc la connaissance des *Lygus*.

Bergsten et al. (2012) ont souligné qu'il était possible d'améliorer considérablement la fiabilité de l'identification par code-barres en limitant la base de séquences de référence au contexte agronomique nécessairement restreint pas rapport à une approche englobant la diversité totale du groupe taxonomique. Nous avons procédé ainsi pour proposer un outil d'identification des espèces d'*Oulema* (Coleoptera, Chrysomelidae) adapté et limité au contexte céréalière français (Leroy et al., 2020). Les espèces d'Espagne et d'Italie qui ne sont pas discriminées par ce marqueur n'étant pas présentes dans les champs de céréales en France ne sont donc pas incluses dans l'analyse. De ce fait, le COI permet de discriminer toutes les espèces françaises susceptibles d'être rencontrées dans les cultures de France métropolitaine. Une telle approche nécessite néanmoins une bonne connaissance préalable de la faune des cultures en question à une échelle supérieure à celle de la France.

Avec le projet de recherche IMPULsE, nous sommes dans cette situation pour les *Lygus* de cultures car nous savons qu'il est possible de rencontrer seulement trois espèces de *Lygus* dans les cultures maraîchères en France : *L. pratensis*, *L. gemellatus* et *L. rugulipennis* (Streito com. pers.). En me limitant à ces trois taxons, je suis à présent en mesure de proposer une clé d'identification morphologique reposant sur des caractères fiables (aux phénomènes d'hybridation près) et un outil moléculaire permettant de séparer *L. rugulipennis* des deux autres espèces.

Concernant l'outil moléculaire, j'ai montré qu'aucun des marqueurs testés ne donnait satisfaction pour discriminer l'ensemble des taxons européens de *Lygus*, ni les trois taxons rencontrés en France. Finalement, le marqueur le moins mauvais qui s'approche le plus de l'identification morphologique est le COI. Compte tenu de la facilité avec laquelle ce gène s'amplifie nous proposons un outil moléculaire de code-barres classique comprenant une base de séquences validées pour les espèces *L. rugulipennis*, *L. pratensis* et *L. gemellatus* (séquences déposées dans Arthémis : base du CBGP dans un premier temps et dans BOLD après publication). Il faudra accompagner cet outil de mises en garde concernant la

discrimination peu fiable de *L. pratensis* et *L. gemellatus*, ainsi que (comme pour la clé morphologique) la non détection d'éventuels hybrides entre ces espèces.

Conclusion de l'étude en taxinomie intégrative des espèces de *Lygus* européennes

D'un point de vue agronomique, l'identification spécifique des ravageurs ne présente un intérêt que si les entités taxonomiques se différencient également par des traits biologiques ayant une importance agronomique, comme par exemple des dégâts spécifiques. Ce point demeure toujours à étudier pour les *Lygus*. Les outils que je suis en mesure de fournir à l'issue de mon travail ne sont certes pas totalement satisfaisants mais permettent tout de même d'améliorer le niveau d'identification de ces espèces de punaises. En différenciant avec une fiabilité très bonne *L. rugulipennis* et *L. pratensis/L. gemellatus* il sera possible de regarder si ces deux entités présentent ou pas des différences biologiques comme un cycle biologique différent ou une particularité quelconque dans l'alimentation pouvant avoir un impact sur la santé des cultures. Jusqu'à présent l'identification restait au niveau générique dans le meilleur des cas empêchant toute investigation en ce sens.

D'un point de vue taxonomique mon étude présente des résultats importants en supprimant deux espèces non fondées, *L. wagneri* et *L. maritimus*. Une augmentation de l'échantillonnage et une étude plus précise de la répartition de chaque taxon devraient permettre aussi de statuer sur les taxons « *italicus* » et « *punctatus* ». D'un point de vue agronomique, ces espèces ne présentent pas d'intérêt car elles sont peu présentes dans les cultures de légumineuses. Par contre du point de vue biogéographique, la phylogéographie à l'échelle mondiale de *L. punctatus* serait particulièrement intéressante à étudier.

La possibilité qu'il existe des hybridations naturelles entre diverses espèces comme entre *L. rugulipennis* et *L. gemellatus* expliquerait la position des trois spécimens « bizarres » qui changent de position en fonction des gènes étudiés. Pour le vérifier il serait intéressant de faire des tests d'hybridation pour voir si les descendants sont viables et vérifier quelle sera leur position phylogénétique, à savoir identique ou pas, à celle de nos trois échantillons dont l'identification moléculaire n'a pas été possible. De même il est probable que *L. pratensis* et *L. gemellatus* soient également inter-fertiles. Là encore, il serait nécessaire de le vérifier expérimentalement afin de pouvoir étayer une éventuelle synonymie entre ces deux espèces au demeurant très proches et si tant est qu'elles soient différentes car mon analyse des réseaux d'haplotypes tend à montrer une absence de différenciation entre ces deux entités. Par ailleurs, la forme des paramères est déterminante chez beaucoup de Miridae en tant que barrière reproductive entre espèces. La forme homogène des paramères dans le genre *Lygus* a d'ailleurs conduit certains auteurs à douter de la validité d'autant d'espèces bien avant les études moléculaires (Southwood et Leston, 1959). On ignore le rôle du spicule dans le processus de copulation mais compte tenu de sa variabilité somme toute assez faible on peut raisonnablement penser que ce caractère ne constitue pas à lui seul une barrière reproductive absolue. En effet, le spicule diffère davantage entre *L. gemellatus* et *L. pratensis* qu'entre *L. gemellatus* et *L. rugulipennis* que nous avons reconnus comme de bonnes

espèces. Ces tests de croisements ne sont possibles que si l'on arrive à différencier correctement ces 3 groupes sur la base de critères morphologiques. C'est une étape cruciale que mon travail permet à présent de réaliser. Ces tests d'hybridation ne pourraient se faire qu'en laboratoire et en conditions contrôlées mais ils pourraient être déterminants pour terminer le travail de clarification de la taxinomie des *Lygus* européens que j'ai commencé.

Conclusion et Perspectives

Mon objectif au sein du projet *IMPULsE* était de valider des outils morphologiques et moléculaires pour permettre d'identifier de façon fiable et à tous les stades de développement les espèces d'intérêt agronomique de deux genres de punaises (*Eurydema* et *Lygus*), des ravageurs importants et émergents des cultures légumières. Ces outils validés seront mis en ligne sous forme de séquences et de photographies de référence accessibles et interrogeables sur la base dédiée du CBGP Arthemis (<http://arthemisdb.supagro.inra.fr>).

Mes deux modèles d'étude étaient très différents : le genre *Eurydema* ne présentait à priori pas de problèmes d'identification morphologique et mon postulat de départ était simplement de vérifier que le code-barres fonctionnait pour discriminer et identifier les espèces d'intérêt ; les espèces du genre *Lygus* étaient au contraire compliquées à identifier morphologiquement et mon objectif était de trouver un marqueur moléculaire qui permette une identification facile et fiable. Les méthodes moléculaires étant dans les deux cas intéressantes pour identifier les œufs et les larves de ces espèces, cette technique s'avère conceptuellement insuffisante d'un point de vue taxonomique (identification des espèces). J'ai donc appliqué le concept de taxinomie intégrative sur le modèle *Eurydema* et sur *Lygus*, associant des approches morphologiques et morphométriques, la caractérisation moléculaire par code-barres et parfois d'autres marqueurs et la caractérisation morphologiques notamment des genitalia mâles sur les plateaux techniques de mon unité de recherche CBGP. J'y ai ajouté des études morphométriques acquises lors de mon cursus EPHE.

Dans le cas d'*Eurydema*, les espèces sont définies essentiellement sur des critères de coloration bien tranchés mais le code-barre a révélé un certain nombre de problèmes taxonomiques dont on ne soupçonnait pas l'existence pour la plupart (à la fois des synonymies potentielles, des espèces cryptiques et des placements discutables dans les sous-genres). Au final et malgré les difficultés rencontrées, les outils que je vais mettre en ligne (séquences COI et iconographie) vont permettre de différencier sans ambiguïté tous les stades des espèces *Eurydema* d'intérêt agronomique (*E. ventralis*, *E. oleracea* et *E. ornata*) et de les différencier des espèces potentiellement invasives qui doivent être surveillées dans le cadre de l'épidémio-surveillance : *Bagrada hilaris*, *Murgantia histrionica* mais aussi les populations ibériques d'*E. ornata*.

Dans le cas des *Lygus*, les espèces sont morphologiquement presque entièrement identiques mis à part des variations subjectives de couleur, ponctuation et pilosité. J'ai étudié les pièces génitales, effectué des analyses morphométriques, calculé les distances génétiques sur plusieurs gènes et enfin appliqué des techniques moléculaires très poussées comme le RADseq pour obtenir une réponse à la question : existe-t-il une ou plusieurs espèces ? La morphométrie de contour a permis de démontrer la variabilité saisonnière souvent constatée mais jamais démontrée. Aucune de ces méthodes ne m'a permis de distinguer toutes les espèces entre elles. Au contraire, les études réalisées mettent en évidence non seulement que le nombre des espèces européennes doit être significativement réduit mais aussi que *L.*

rugulipennis a des affinités avec les espèces américaines et que les distances génétiques entre les espèces européennes et américaines sont relativement faibles. Dans un contexte agronomique je vais pouvoir proposer un outil d'identification morphologique pour les trois espèces qui méritent d'être maintenues : *L. rugulipennis*, *L. pratensis* et *L. gemellatus*. Le code-barre permettra quant à lui de distinguer (à quelques exceptions près) *L. rugulipennis* des deux autres espèces. C'est peu satisfaisant mais néanmoins un progrès dans la mesure où l'on pourra au moins séparer les larves de *L. rugulipennis* de celles de *L. pratensis*/*L. gemellatus* dans les futures études.

Si je compare la taxinomie du genre *Lygus* avec celle du genre *Eurydema*, cette dernière était en définitive assez stable et ce depuis très longtemps mais basée sur des caractères de coloration dont on connaît la variabilité et elle n'a pas totalement résisté à l'utilisation de techniques complètement différentes. Dans les deux genres, la taxinomie intégrative a montré toute sa valeur et sa puissance.

La découverte d'une diversité cryptique peut avoir des conséquences importantes sur les estimations de la biodiversité mondiale, la planification de la conservation et la gestion des ennemis et des maladies notamment dans le domaine de la protection des plantes. Des espèces similaires sur le plan morphologique peuvent varier dans leur statut de ravageur en raison de différences génotypiques et/ou phénotypiques qui influencent leur gamme d'hôtes et leur spécificité, leur distribution géographique, leur capacité à coloniser une culture et à commettre des dégâts ou bien encore leur résistance aux insecticides. Par conséquent, la reconnaissance des espèces cryptiques et des différences dans leur biologie et leur écologie est essentielle pour une gestion efficace, avec des implications importantes pour la santé publique, l'agriculture et les politiques de conservation de la biodiversité. La mise en évidence de deux clades bien différenciés au sein d'*Eurydema ornata* qui est un des principaux ravageurs du chou est un cas typique de diversité cryptique susceptible d'accroître le risque d'émergence de nouveaux ravageurs. À l'inverse l'étude des *Lygus* montre que l'on surestime sans doute la diversité au sein de ce genre. Une simplification taxonomique qui va se traduire par la mise en synonymie de plusieurs espèces facilitera la tâche des agronomes qui auront ainsi moins de problèmes d'identification mais surtout moins d'espèces à prendre en compte inutilement dans leur mise au point de méthodes de contrôle des populations.

Le projet IMPULsE concernait uniquement les espèces d'intérêt agronomique même si l'inclusion d'espèces de milieux naturels était nécessaire pour valider mes outils. La résolution de tous les problèmes soulevés concernant notamment des espèces sans intérêt agronomique sortait du cadre du projet et des moyens alloués, aussi plusieurs cas ne sont pas encore tranchés et plusieurs hypothèses sont encore à tester avant de répondre à certaines questions restées en suspens :

1) Nous avons collecté ou obtenu des échantillons d'espèces-clés ou de localités importantes en 2019 et 2020 qui n'ont pas encore pu être étudiés. Ils sont peu nombreux mais susceptibles d'apporter des éclairages nouveaux et nous allons les séquencer prochainement,

2) Améliorer le RADseq des *Lygus* en ajoutant des espèces et des échantillons pour conforter les résultats préliminaires obtenus ici, notamment en rajoutant les deux espèces *L. pratensis* et *L. rugulipennis* fondamentales mais pour lesquels les premières expérimentations en RADseq n'ont pas fonctionné.

3) Confirmer les synonymies entre *L. gemellatus/L. maritimus* et *L. italicus* en augmentant le nombre de localités dans l'échantillonnage, de même qu'entre *L. pratensis* et *L. wagneri* : résoudre la question de « *L. punctatus* » du Mercantour, l'obtention de spécimens d'Amérique du Nord permettrait de les situer de façon moléculaire par rapport à *L. pratensis*, de les comparer aux spécimens du Mercantour et de proposer le cas échéant une synonymie avec *L. pratensis*.

Ces quelques travaux supplémentaires me permettront de publier mon travail. À plus long terme et dans le cadre de nouveaux projets de recherche, les questions suivantes seraient intéressantes à développer :

1) Effectuer des tests d'hybridation en milieu expérimental entre plusieurs espèces de *Lygus* et d'*Eurydema* s'avèrerait très utile pour statuer sur le statut spécifique de certains taxons.

2) Vérifier et d'étudier plus précisément l'effet de la température ou d'autres conditions environnementales sur la diversité de coloration des *Eurydema* (*E. cyanea/E. dominulus, E. herbacea/E. oleracea* seraient deux bons sujets d'étude) et des *Lygus*.

3) Etudier les bactéries endosymbiotiques chez *Eurydema* ainsi que chez *Lygus*, celles-ci pouvant éventuellement expliquer certaines hybridations et/ou barrières reproductives.

4) Rechercher des parasitoïdes couplés aux *Lygus* et aux *Eurydema* en tant que possibles agent de lutte biologique contre les espèces de ces genres. Au regard des faibles distances génétiques entre les *Lygus* européens et américains, les cortèges de parasitoïdes sont-ils les mêmes et pourraient-ils passer d'une espèce à l'autre le cas échéant ?

5) Mettre au point des méthodes pour rechercher les deux genres dans le contenu digestif de leurs prédateurs à partir de la base de référence de séquences que j'ai constituée pour ces ravageurs de manière à reconstruire les réseaux trophiques dans une optique appliquée d'optimisation des régulations naturelles.

6) Utiliser le logiciel « Phylomorphospace » pour relier la phylogénie avec des informations morphométriques serait très utile pour les deux modèles d'étude mais nécessiterait un échantillonnage beaucoup plus important.

7) Effectuer l'étude des chromosomes et des caryotypes peut également être envisagée comme cela a été fait sur le complexe d'espèces *Macrolophus* (Jauset et al., 2015) pour différencier les espèces.

Au-delà du domaine agronomique, il s'avère que le genre *Eurydema* constitue un modèle très riche pour étudier les phénomènes de spéciation aussi bien d'origine géographique, qu'alimentaire et/ou écologique et qui mériterait à lui seul le montage de plusieurs programmes de recherche passionnants en écologie évolutive.

BIBLIOGRAPHIE

- ADAMS D.C., ROHLF F.J., SLICE D.E., (2004). Geometric morphometrics: Ten years of progress following the 'revolution'. *Italian Journal of Zoology*, 71, 5-16.
- AGLYAMZYANOV, R.S., (1986). Die räumliche Struktur der Populationen und die Registrierung der Halbflügler. *Die Unionskonferenz nach den Problemen des Katasters und der Registrierung des Tierreiches*, 2, 460.
- AGLYAMZYANOV, R.S., (1987). Einige Aspekte der Nahrungsverbindungen der Halbflügler der Gattung *Lygus* Hahn (Hemiptera, Miridae) des Swerdlowsk-Gebietes. *Fauna und Ökologie der Insekten des Urals*, Moskau, 3, 4.
- AGLYAMZYANOV, R.S., (1990). Zur Frage über die Untersuchung der saisonalen Veränderung der Arten der Gattung *Lygus* Hahn (Heteroptera, Miridae). - *Das Tierreich des Südlichen Urals*, Orenburg, 3-5.
- AGLYAMZYANOV, R.S., (2003). Synonymy of two *Lygus* species from Inner Mongolia (Heteroptera: Miridae). *Zoosystematica Rossica*, 11 (2), 326.
- AGLYAMZYANOV, R.S., (2005a). *Lygus poluensis* Wagner and its synonyms (Heteroptera: Miridae). - *Zoosystematica Rossica*, 14 (1), 76.
- AGLYAMZYANOV, R.S., (2005b). On the taxonomic status of *Lygus israelensis* Linnavuori, 1962 (Heteroptera: Miridae). *Zoosystematica Rossica*, 14 (2), 211-212.
- AGLYAMZYANOV, R.S., (2006). Revision der paläarktischen Arten der Gattung *Lygus* Hahn (Heteroptera, Miridae). Thèse de Doctorat Université de Gutenberg (Mainz). 70pp.
- AGLYAMZYANOV R.S. (2009). Revision of the Palearctic species of *Lygus* Hahn, 1833 (Heteroptera: Miridae). *Entomologische Zeitschrift mit Insekten-Börse*, 119 (6), 249–276.
- AL KHATIB, F., FUSU, L., CRUAUD, A., GIBSON, G., BOROWIEC, N., RASPLUS, J.-Y., RIS, N., DELVARE, G., (2014). An integrative approach to species discrimination in the *Eupelmus urozonus* complex (Hymenoptera, Eupelmidae), with the description of 11 new species from the Western Palearctic. *Systematic Entomology*, 39, 806–862.
- AL KHATIB, F., CRUAUD, A., FUSU, L., GENSON, G., RASPLUS, J.-Y., RIS, N., DELVARE, G., (2016). Multilocus phylogeny and ecological differentiation of the “*Eupelmus urozonus* species group” (Hymenoptera, Eupelmidae) in the West-Palearctic. *BMC Evolutionary Biology*, 16, 1-20.
- ALSTRÖM, P., RASMUSSEN, P.C., OLSSON, U., SUNDBERG, P., (2008). Species delimitation based on multiple criteria: the Spotted Bush Warbler *Bradypterus thoracicus* complex (Aves: Megaluridae). *Zoological Journal of the Linnean Society*, 154, 291–307. <https://doi.org/10.1111/j.1096-3642.2008.00418.x>.
- ANDREWS, K.R., GOOD, J.M., MILLER, M.R., LUIKART, G., HOHENLOHE, P.A., (2016). Harnessing the power of RADseq for ecological and evolutionary genomics. *Nature Review Genetics*, 17, 81–92. <https://doi.org/10.1038/nrg.2015.28>.
- ARNQVIST G., MARTENSSON T., (1998). Measurement error in geometric morphometrics: empirical strategies to assess and reduce its impact on measure of shape. *Acta Zoologica Academiae Scientiarum Hungaricae*, 44, 73-96.
- ASANOVA R B., ISKAKOV B. V., (1977) Harmful and Useful Hemipterans (Heteroptera) of Kazakhstan. *Determinable*. Alma Ata, Kainar, 124-126.
- AUKEMA B., RIEGER C. RABITSCH W., (2013). Catalogue of the Heteroptera of the Palearctic Region. Vol. 6. Supplement. *The Netherlands Entomological Society, Amsterdam, the Netherlands*. I-XXIV + 629 p.
- AVISE, J., BALL, R., (1990). Principles of genealogical concordance in species concepts and biological taxonomy. *Surveys in Evolutionary Biology*, 7, 45-67.
- BAGLEY, R.K., SOUSA, V.C., NIEMILLER, M.L., LINNEN, C.R., (2017). History, geography and host use shape genomewide patterns of genetic variation in the redheaded pine sawfly (*Neodiprion lecontei*). *Molecular Ecology*, 26, 1022–1044. <https://doi.org/10.1111/mec.13972>.
- BALACHOWSKY, A.S., MESNIL, L., (1936). Les insectes nuisibles aux plantes cultivées. Leurs mœurs. Leur destruction. *Traité d'entomologie agricole concernant la France, la Corse, l'Afrique du Nord et les régions limitrophes*. Paris, Etablissements Busson, 1535-1539.
- BALMES, V., MOUTTET, R., (2017). Development and validation of a simplified morphological identification key for larvae of tephritid species most commonly intercepted at import in Europe. *EPPPO Bulletin*, 47, 91–99. <https://doi.org/10.1111/epp.12369>.

- BERGSTEN J., BILTON D. T., FUJISAWA T., ELLIOTT M., MONAGHAN M. T., BALKE M., HENDRICH L., GEIJER J., HERRMANN J., FOSTER G. N., RIBERA I., NILSSON A.N., BARRACLOUGH T. G. VOGLER A.P., (2012). The Effect of Geographical Scale of Sampling on DNA Barcoding. *Systematic Biology*, 61(5), 851–869.
- BICKFORD D., LOHMAN, D.J., SODHI, N.S., NG, P.K.L., MEIER, R., WINKER, K., INGRAM, K.K., DAS, I., (2007). Cryptic species as a window on diversity and conservation. *Trends in Ecology and Evolution*, 22(3), 148-155. <https://doi.org/10.1016/j.tree.2006.11.004>.
- BOAKE, C.R.B., PRICE, D.K. & ANDREADIS D.K., (1998). Inheritance of behavioural differences between two interfertile, sympatric species, *Drosophila silvestris* and *D. heteroneura*. *Heredity*, 80, 642–650.
- BONNEMAISON, L., (1961). Les ennemis animaux des plantes cultivées et des forêts, tome I. Paris, Editions Sep, 605 pp.
- BOOKSTEIN F.L., (1981). Looking at mandibular growth: some new geometrical methods. In D. Carlson, ed. Craniofacial biology. University of Michigan, Ann.74-79.
- BOOKSTEIN F.L., (1982). Foundations of morphometrics. *Annual Review of Ecology and Systematics*, 13, 451-470.
- BOOKSTEIN F.L., (1986). Size and shape spaces for landmark data in two dimensions. *Statistic Science*, 1, 181-222.
- BOOKSTEIN F.L., (1991). Morphometric tools for landmark data: Geometry and Biology. Cambridge: Cambridge University Press. 435 pp.
- BOURGOIN T. CAMPBELL B. C., (2002). Inferring a phylogeny for Hemiptera: falling into the “Autapomorphic Trap”. *Denisia*, 4, 67-82.
- BREESCHOTEN T., DOORENWEERD C., TARASOV S., VOGLER A.P., (2016). Phylogenetics and biogeography of the dung beetle genus *Onthophagus* inferred from mitochondrial genomes. *Molecular Phylogenetics Evolution*, 105, 86–95.
- BUNDY C.S., PERRING T.M., REED D.A., PALUMBO J.C., GRASSWITZ T.R. JONES W.A., (2018). *Bagrada hilaris* (Burmeister). Chapitre 3 in : Mc Pherson J.E. (ed.) Invasive Stink Bugs and Related Species (Pentatomidae). CRC Press, 205-241.
- BURANGE, P.S., ROEHRDANZ, R.L., BOETEL, M.A., (2012). Geographically Based Diversity in Mitochondrial DNA of North American *Lygus lineolaris* (Hemiptera: Miridae). *Annals of Entomological Society of America* 105, 917–929. <https://doi.org/10.1603/AN11146>.
- CATCHEN, J.M., AMORES, A., HOHENLOHE, P., CRESKO, W., POSTLETHWAIT, J.H., (2011). Stacks : Building and Genotyping Loci De Novo From Short-Read Sequences. *G3: Genes, Genomes, Genetics*, 1 (3), 171–182. <https://doi.org/10.1534/g3.111.000240>.
- CATCHEN, J., HOHENLOHE, P.A., BASSHAM, S., AMORES, A., CRESKO, W.A., (2013). Stacks: an analysis tool set for population genomics. *Molecular Ecology* 22, 3124–3140. <https://doi.org/10.1111/mec.12354>.
- CLARE, E.L., LIM, B.K., FENTON, M.B., HEBERT, P.D.N., (2011). Neotropical Bats: Estimating Species Diversity with DNA Barcodes. *PLOS ONE* 6, e22648. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0022648>.
- CARVALHO, J.C.M., (1956b). On a new genus of mirid from the Biliran Island (Hemiptera). *Anais da Academia Brasileira de Ciencias*, 28, 215-216.
- COBBEN, R.H., (1958). Biotaxonomische Einzelheiten über Niederländische Wanzen (Hemiptera, Heteroptera). *Tijdschrift voor Entomologie*, 101, 1-46.
- CODE INTERNATIONAL DE NOMENCLATURE ZOOLOGIQUE, (1999). 4^e édition, sur iczn.org le site de la Commission internationale de nomenclature zoologique (CINZ).
- COGNATO, A.I., (2006). Standard Percent DNA Sequence Difference for Insects Does Not Predict Species Boundaries. *Journal of Economic Entomology*, 99, 1037–1045. <https://doi.org/10.1093/jee/99.4.1037>.
- COOPER, W.R., SPURGEON, D.W., (2013). Temperature-dependent egg development of *Lygus hesperus* (Hemiptera: Miridae). *Journal of Economic Entomology*, 106 (1), 124-30.
- CRUAUD, A., GAUTIER, M., GALAN, M., FOUCAUD, J., SAUNE, L., GENSON, G., DUBOIS, E., NIDELET, S., DEUVE, T., RASPLUS, J.-Y., (2014). Empirical Assessment of RAD Sequencing for Interspecific Phylogeny. *Molecular Biology and Evolution*, 31, 1272–1274. <https://doi.org/10.1093/molbev/msu063>.

- CRUAUD, A., GAUTIER, M., ROSSI, J.-P., RASPLUS, J.-Y., GOUZY, J., (2016). RADIS: analysis of RAD-seq data for interspecific phylogeny. *Bioinformatics*, 32, 3027–3028. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btw352>.
- CRUAUD, P., RASPLUS, J.-Y., RODRIGUEZ, L.J., CRUAUD, A., (2017). High-throughput sequencing of multiple amplicons for barcoding and integrative taxonomy. *Scientific Reports*, 7, 1-12. <https://doi.org/10.1038/srep41948>.
- CRYAN, J.R., URBAN, J.M., (2012). Higher-level phylogeny of the insect order Hemiptera: is Auchenorrhyncha really paraphyletic? *Systematic Entomology*, 37, 7–21. <https://doi.org/10.1111/j.1365-3113.2011.00611.x>.
- DAYRAT, B., (2005). Towards integrative taxonomy. *Biological Journal of the Linnean Society*, 85, 407–415. <https://doi.org/10.1111/j.1095-8312.2005.00503.x>.
- DEMCHENKO, N.Y.U., (2003). *Lygus adspersus* (Schilling, 1837) is a synonym of *L. gemellatus* (Herrich-Schaefer, 1835) (Heteroptera: Miridae). *Zoosystematica Rossica*, 12 (2), 225-226.
- DE QUEIROZ, K., (2007). Species Concepts and Species Delimitation. *Systematic Biology*, 56, 879–886. <https://doi.org/10.1080/10635150701701083>.
- DERJANSCHI V., PERICART J., (2005). Faune de France 90 – Hémiptère Pentatomoidea Euro-Méditerranéens Vol.1. Paris : *Fédération française des sociétés de sciences naturelles*, 494 pp.
- DOBZHANSKY, T., (1937). Genetics and the Origin of Species. *Columbia University Press*, New York, NY, 364 pp.
- DUJARDIN J.-P.A., KABA D., HENRY A.B., (2010). The exchangeability of shape. *BMC Research Notes*, 3, 2-66.
- DUPUIS, C., (1951). Les espèces françaises du genre *Eurydema* Laporte (Hemiptera Pentatomoidea, subfam. Pentatominae). Révision systématique avec une introduction à l'étude morphologique des organes génitaux externe des Pentatomoidea. *Annales de la Société Entomologique de France*, 118, 1-28.
- DUPUIS, C., (1959). Notes, remarques et observations diverses sur les Hémiptères. Quatrième série: Note XI- Les processus supérieurs de la chambre génitale mâle des Pentatomoidea. Cahiers des Naturalistes Parisiens, *Bulletin des Naturalistes Parisiens*, 15, 46-51.
- EGAN, S.P., RAGLAND, G.J., ASSOUR, L., POWELL, T.H.Q., HOOD, G.R., EMRICH, S., NOSIL, P., FEDER, J.L., (2015). Experimental evidence of genome-wide impact of ecological selection during early stages of speciation-with-gene-flow. *Ecology Letters*, 18, 817–825. <https://doi.org/10.1111/ele.12460>.
- EHANNO B., (1987). Les Hétéroptères Miridae de France, Tome 2B: Inventaire biogéographique et atlas. – Muséum National d'Histoire Naturelle, Inventaires de Faune et de Flore fasc. 42, Secrétariat de la Faune et de la Flore, Paris, 427 pp.
- EKREM, T., STUR, E., HEBERT, P.D.N., (2010). Females do count: Documenting Chironomidae (Diptera) species diversity using DNA barcoding. *Organisms Diversity & Evolution*, 10, 397–408. <https://doi.org/10.1007/s13127-010-0034-y>.
- ELIAS, M., CONDAMINE, F. (2014). Découverte et analyse de la biodiversité : les moyens actuels. *Mémoires de la Société Entomologique de France*, 9, 23-39.
- ELIAS, M., HILL, R.I., WILLMOTT, K.R., DASMAHAPATRA, K.K., BROWER, A.V.Z., MALLETT, J., JIGGINS, C.D., (2007). Limited performance of DNA barcoding in a diverse community of tropical butterflies. *Proceedings of the Royal Society B-Biological Sciences* 274, 2881–2889. <https://doi.org/10.1098/rspb.2007.1035>.
- ENCE, D.D., CARSTENS, B.C., (2011). SpedeSTEM: a rapid and accurate method for species delimitation. *Molecular Ecology Resources*, 11(3), 473-480.
- EPPO. 2008. Alert List. *Lygus lineolaris*. https://www.eppo.int/ACTIVITIES/plant_quarantine/alert_list.
- ERDELYI C., MANNINGER S., MANNINGER K., GERGELY K., HANGYEL L., BERNATH, I., (1994) Climatic factors affecting population dynamics of the main seed pests of lucerne in Hungary. *Journal of Applied Entomology*, 117, 195–209.
- FIEBER, F.X., (1861). Die europäischen Hemiptera. Halbflügler (Rhynchota Heteroptera). Gerold's Sohn (eds), Wien, 113-444.
- FOLMER, O., BLACK, M., HOEH, W., LUTZ, R., VRIJENHOEK, R., (1994). DNA primers for amplification of mitochondrial cytochrome c oxidase subunit I from diverse metazoan invertebrates. *Molecular Marine Biology and Biotechnology*, 3 (5), 294-9.
- FORERO, D., (2008). The systematics of the Hemiptera. *Revista Colombiana de Entomología*, 34 (1), 1-21.
- FULTON, T.L., LETTS, B., SHAPIRO, B., (2012). Multiple losses of flight and recent speciation in steamer ducks. *Proceedings of the Royal Society B-Biological Sciences*, 279, 2339–2346.

- FYE, R.E., (1982). Weed Hosts of the *Lygus* (Heteroptera: Miridae) Bug Complex in Central Washington. *Journal of Economic Entomology*, 75, 724–727. <https://doi.org/10.1093/jee/75.4.724>.
- GAUSE G. F., (1935). Vérifications expérimentales de la théorie mathématique de la lutte pour la vie. Hermann et Cie, éditeurs, Paris. 277 pp.
- GEBIOLA, M., GOMEZ-ZURITA, J., MONTI, M.M., NAVONE, P., BERNARDO, U., (2012). Integration of molecular, ecological, morphological and endosymbiont data for species delimitation within the *Pnigalio soemius* complex (Hymenoptera: Eulophidae). *Molecular Ecology*, 21, 1190–1208. <https://doi.org/10.1111/j.1365-294X.2011.05428.x>.
- GEBIOLA, M., MONTI, M.M., JOHNSON, R.C., WOOLLEY, J.B., HUNTER, M.S., GIORGINI, M., PEDATA, P.A., (2017). A revision of the *Encarsia pergandiella* species complex (Hymenoptera: Aphelinidae) shows cryptic diversity in parasitoids of whitefly pests. *Systematic Entomology*, 42, 31–59. <https://doi.org/10.1111/syen.12187>.
- GILLESPIE, D.R., GILLESPIE, D.R., FOOTTIT, R.G., SHIPP, J.L., SCHWARTZ, M.D., QUIRING, D.M.J., WANG, K., (2003). Diversity, distribution and phenology of *Lygus* species (Hemiptera: Miridae) in relation to vegetable greenhouses in the lower Fraser Valley, British Columbia, and southwestern Ontario. *Journal of the Entomological Society of British Columbia*, 100, 43–54.
- GRAHAM, H.M., (1982). Interbreeding of *L. elisus* Van Duzee and *L. desertinus* Knight in the field. *Southwest Entomology*, 7 (1), 60-61.
- GRAHAM, M., R.L. CARRANZA, (1983). Mesoscutal markings of *Lygus desertinus* Knight as effected temperature. *Southwest Entomology*, 8 (3), 190-193.
- HAJIBABAEI, M., JANZEN, D.H., BURNS, J.M., HALLWACHS, W., HEBERT, P.D.N., (2006). DNA barcodes distinguish species of tropical Lepidoptera. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 103, 968–971. <https://doi.org/10.1073/pnas.0510466103>.
- HAHN, C.W., (1833). Die Wanzenartigen Insecten. Getreu nach der Natur abgebildet und beschrieben. Zeh, Nürnberg. 1: 119-236.
- HALL, T.A., (1999). BioEdit: A User-Friendly Biological Sequence Alignment Editor and Analysis Program for Windows 95/98/NT. *Nucleic Acids Symposium Series*, 41, 95-98.
- HAMBÄCK, P.A., WEINGARTNER, E., ERICSON, L., FORS, L., CASSEL-LUNDHAGEN, A., STENBERG, J.A., BERGSTEN, J., (2013). Bayesian species delimitation reveals generalist and specialist parasitic wasps on *Galerucella* beetles (Chrysomelidae): sorting by herbivore or plant host. *BMC Evolutionary Biology*, 13, 92. <https://doi.org/10.1186/1471-2148-13-92>.
- HANDLEY, D. T., POLLARD, J.E., (1993). Microscopic examination of tarnished plant bug (Heteroptera: Miridae) feeding damage to strawberry. *Journal of Economic Entomology*, 86, 505-510.
- HARAN, J., DELVARE, G., VAYSSIERES, J.-F., BENOIT, L., CRUAUD, P., RASPLUS, J.Y., CRUAUD, A., (2018). Increasing the utility of barcode databases through highthroughput sequencing of amplicons from dried museum specimens, an example on parasitic Hymenoptera (Braconidae). *Biological Control*, 122, 93-100. <https://doi.org/10.1016/j.biocontrol.2018.04.001>.
- HARLAN, J.R., DE WET, J.M.J., (1963). The Compilospecies concept. *Evolution*, 17, 497-501.
- HARRY, M., (2008). Génétique moléculaire et évolutive. Collection Science Fondamentale, Maloigne, Paris, seconde édition, 465p.
- HAYE, T., GARIEPY, T., HOELMER, K., ROSSI, JP., STREITO, J.-C., TASSUS, X., DESNEUX, N., (2015). Range expansion of the invasive brown marmorated stinkbug, *Halyomorpha halys*: an increasing threat to field, fruit and vegetable crops worldwide. *Journal of Pests Science*, 88, 665-673. <https://doi.org/10.1007/s10340-015-0670-2>.
- HEBERT, P.D.N., CYWINSKA, A., BALL, S.L., DEWAARD, J.R., (2003). Biological identifications through DNA barcodes. *Proceedings of the Royal Society of London. Series B*, 270, 313–321. <https://doi.org/10.1098/rspb.2002.2218>.
- HEBERT, P.D.N., PENTON, E.H., BURNS, J.M., JANZEN, D.H., HALLWACHS, W., (2004). Ten species in one: DNA barcoding reveals cryptic species in the neotropical skipper butterfly *Astrartes fulgurator*. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 101, 14812–14817. <https://doi.org/10.1073/pnas.0406166101>.
- HEISS E., (1983). Heteropteren aus Kreta I (Insecta: Heteroptera). *Berichte des Naturwissenschaftlich-medizinischen Vereins in Innsbruck*, 70, 135–144.
- HENNIG, W., (1966). Phylogenetics Systematics. University of Illinois Press, Urbana, 263 pp.
- HENRY, Ch.S., (1985). The proliferation of cryptic species in *Chrysoperla* green lacewings through song divergences. *The Florida Entomologists*, 68, 18-38.

- HENRY, Ch.S., BROOKS, S.J., JOHNSON, J.B. DUELLI, P., (1996). *Chrysoperla lucasina* (Lacroix): a distinct species of green lacewing, confirmed by acoustical analysis (Neuroptera: Chrysopidae). *Systematic Entomology*, 21, 205-218.
- HENRY, T. J., (2009). Biodiversity of Heteroptera. *Insect biodiversity Science and Society*, 1, 223–263.
- HERATY, J., HAWKS, D., KOSTECKI, J.S., CARMICHAEL, A., (2004). Phylogeny and behaviour of the Gollumiellinae, a new subfamily of the ant-parasitic Eucharitidae (Hymenoptera: Chalcidoidea). *Systematic Entomology*, 29, 544–559. <https://doi.org/10.1111/j.0307-6970.2004.00267.x>.
- HERRICH-SCHÄFFER, G.A.W., (1835a). Nomenclator entomologicus. Verzeichniss der europäischen Insecten ; zur Erleichterung des Tauschverkehrs mit Preisen versehen. Heft 1 ; Lepidoptera und Hemiptera, letztere synoptisch bearbeitet und mit vollständiger Synonymie : i-iv. Pustet, Regensburg, 1-116.
- HERRICH-SCHÄFFER, G.A.W., (1835b). Fauna insectorum Germaniae initia oder Deutschlands Insecten. Regensburg, 135, 1-24.
- HICKERSON, M. J., STAHL, E.A., LESSIOS, H.A., (2006). Test for simultaneous divergence using approximate Bayesian computation. *Evolution*, 60, 2435–2453.
- HOLOPAINEN, J.K., VARIS, A.-L., (1991). Host plants of the European tarnished plant bug *Lygus rugulipennis* Poppius (Het., Miridae). *Journal of Applied Entomology*, 111, 484–498. <https://doi.org/10.1111/j.1439-0418.1991.tb00351.x>.
- HORI, K., HANADA, T., (1970) Biology of *Lygus disponsi* Linnavuori (Hemiptera: Miridae) in Obihiro. *Research Bulletin of Obihiro University*, 6, 304-317.
- HORVATH, G., (1911). Hemiptera nova vel minus cognita e regione palaeartica II. *Annales Historico-Naturales Musei Nationalis Hungarici*, 9, 573-610.
- HULL, J.J., GEIB, S.M., FABRICK, J.A., BRENT, C.S., (2013). Sequencing and De Novo Assembly of the Western Tarnished Plant Bug (*Lygus hesperus*) Transcriptome. *PLoS ONE*, 8(1): e55105. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0055105>.
- HUTCHINSON, G.E., (1957). Concluding remarks. Cold Spring Harb. Symp. *Quantitative Biology*, 22, 415–427.
- JAUSET, A.M., EDO-TENA, E., CASTAÑE, C., AGUSTI, N., ALOMAR, O., GROZEVA, S., (2015). Comparative cytogenetic study of three *Macrolophus* species (Heteroptera, Miridae). *Comparative Cytogenetics*, 9, 613–623. <https://doi.org/10.3897/CompCytogen.v9i4.5530>.
- JERMIIN, LARSS., CROZIER, ROSSH., (1994). The cytochrome b region in the mitochondrial DNA of the ant *Tetraponera rufoniger*: Sequence divergence in hymenoptera may be associated with nucleotide content. *Journal of Molecular Evolution*, 38, 282-294. <https://doi.org/10.1007/BF00176090>.
- JI, Y.-J., ZHANG, D.-X., HE, L.-J., (2003). Evolutionary conservation and versatility of a new set of primers for amplifying the ribosomal internal transcribed spacer regions in insects and other invertebrates. *Molecular Ecology Notes*, 3, 581–585. <https://doi.org/10.1046/j.1471-8286.2003.00519.x>.
- JOHNSON, K.P., DIETRICH, C.H., FRIEDRICH, F., BEUTEL, R.G., WIPFLER, B., PETERS, R.S., ALLEN, J.M., PETERSEN, M., DONATH, A., WALDEN, K.K.O., KOZLOV, A.M., PODSIADLOWSKI, L., MAYER, C., MEUSEMANN, K., VASILIKOPOULOS, A., WATERHOUSE, R.M., CAMERON, S.L., WEIRAUCH, C., SWANSON, D.R., PERCY, D.M., HARDY, N.B., TERRY, I., LIU, S., ZHOU, X., MISOF, B., ROBERTSON, H.M., YOSHIZAWA, K., (2018). Phylogenomics and the evolution of hemipteroid insects. *Proceedings of the National Academy of Sciences of America*, 115 (50), 12775–12780. www.pnas.org/cgi/doi/10.1073/pnas.1815820115.
- JUNG, S., LEE, S., (2012). Molecular phylogeny of the plant bugs (Heteroptera: Miridae) and the evolution of feeding habits. *Cladistics*, 28, 50–79. <https://doi.org/10.1111/j.1096-0031.2011.00365.x>.
- JUNG, S., KERZHNER, I.M., LEE, S., (2011). Species of the genus *Eurydema* (Hemiptera: Heteroptera: Pentatomidae) in Far East Asia: an integrated approach using morphological, molecular, and data crossing analyses for taxonomy. *Zootaxa*, 2917, 48–58.
- KAPANTAIDAKI, D.EV., EVANGELOU, V.I., MORRISON, W.R., LESKEY, T.C., BRODEUR, J., MILONAS, P., (2019). *Halyomorpha halys* (Hemiptera: Pentatomidae) Genetic Diversity in North America and Europe. *Insects*, 10 (6), 174. <https://doi.org/10.3390/insects10060174>.
- KEIZI KIRITANI, (2011). Impacts of global warming on *Nezara viridula* and its native congeneric species. *Journal of Asia-Pacific Entomology*, 14 (2), 221–226.
- KELTON, L.A., (1975). The *Lygus* bugs (genus *Lygus* Hahn) of North America (Heteroptera : Miridae). *Memoirs of the Entomological Society of Canada*, 95, 1-101.

- KERR, K.C.R., STOECKLE, M.Y., DOVE, C.J., WEIGT, L.A., FRANCIS, C.M., HEBERT, P.D.N., (2007). Comprehensive DNA barcode coverage of North American birds. *Molecular Ecology Notes*, 7, 535-543. <https://doi.org/10.1111/j.1471-8286.2006.01670.x>.
- KERZHNER I.M. JOSIFOV M., (1999). Miridae : in Aukema B. Rieger C., Catalogue of the Heteroptera of the Palearctic Region. Vol. 3. Cimicomorpha II. The Netherlands Entomological Society, Amsterdam, the Netherlands. 576 pp.
- KIM, J., JUNG, S., (2018). COI barcoding of plant bugs (Insecta: Hemiptera: Miridae). *PeerJ* 6, e6070. <https://doi.org/10.7717/peerj.6070>.
- KULLENBERG, B., (1944). Studien über die Biologie des Capsiden. *Zoologische Bidrag fran Uppsala*, 23, 1-522.
- KUMAR, S., STECHER, G., LI, M., KNYAZ, C., TAMURA, K. (2018). Phylogenetic and molecular evolutionary analyses were conducted using MEGA version X. *Molecular biology and evolution*, 35 (6), 1547-1549.
- LANFEAR, R., FRANSEN, P. B., WRIGHT, A. M., SENFELD, T., CALCOTT, B., (2016) PartitionFinder 2: new methods for selecting partitioned models of evolution for molecular and morphological phylogenetic analyses. *Molecular biology and evolution*, 34 (3), 772-773. <https://doi.org/10.1093/molbev/msw260>.
- LECOINTRE, G., LE GUYADER H., (2009). Classification phylogénétique du vivant. 3 ème edition, illustrations VISSET D.. Belin, 559 pp.
- LEROY J., CHAPELIN-VISCARDI J.-D., GENSON G., HARAN J., PIERRE E., STREITO J.C., (2020). Distinction by barcoding of Cereal leaf beetles including *Oulema melanopus* and *Oulema duftschmidi* (Coleoptera: Chrysomelidae), two syntopical sibling species. Soumis à *European Journal of Entomology*.
- LESTON, D., (1952). On certain subgenera of *Lygus* Hahn 1833 (Hem., Miridae), with a review of the British species. *Entomologist's Gazette*, 3, 213-230.
- LI, N., ZHANG, H., LI, S., BAI, M., (2017). Geometric morphometric analysis of *Eysarcoris guttiger*, *E. annamita* and *E. ventralis* (Hemiptera: Pentatomidae). *Zoological Systematics*, 42 (1), 90-101. doi: 10.11865/zs.201708.
- LINNAVUORI, R., (1960). Hemiptera of Israel. I.- *Annales Zoologici Societatis Zoologicae Botanicae Fennicae 'Vanamo'*, 22 (1), 1-71.
- LUMLEY, L.M., SPERLING, F. A. H., (2010). Integrating morphology and mitochondrial DNA for species delimitation within the spruce budworm (*Choristoneura fumiferana*) cryptic species complex (Lepidoptera: Tortricidae). *Systematic Entomology*, 35, 416-428. <https://doi.org/10.1111/j.1365-3113.2009.00514.x>.
- LUMLEY, L.M., CUSSON, M., (2013). Linking adaptation, delimitation of evolutionarily significant units (ESUs), and gene function: a case study using hemlock looper ecotypes. *Systematic Entomology*, 38, 428-439. <https://doi.org/10.1111/syen.12005>.
- LUPOLI, R., (1997) Notes sur quelques punaises peu connues (Heteroptera, Pentatomidae, Eurydemini et Podopinae) rencontrées sur les Crucifères. *Entomologiste*, 53 (2), 87-91.
- LUPOLI R., DUSOULIER F., (2015). Les punaises Pentatoimoidea de France. Ed *Ancyrosoma*, Fontenay-sous-bois. 429 pp.
- LUPOLI, R., DUSOULIER, F., CRUAUD, A., CROS-ARTEIL, S., STREITO, J.-C., (2013). Morphological, biogeographical and molecular evidence of *Carpocoris mediterraneus* as a valid species (Hemiptera: Pentatomidae). *Zootaxa*, 3609 (4), 392-410. <https://doi.org/10.11646/zootaxa.3609.4.2>.
- MAYDEN R., (1997). A hierarchy of species concepts: The denouement in the saga of the species problem. In CLARIDGE, M. F., DAWAH, H. A., WILSON, M. R., eds. *Species: The units of biodiversity*. Chapman and Hall, 381-424
- MAYR, E., (1942). Systematics and the Origin of Species. Columbia University Press, New York, NY.
- MEIER, R., SHIYANG, K., VAIDYA, G., NG, P.K.L., (2006). DNA Barcoding and Taxonomy in Diptera: A Tale of High Intraspecific Variability and Low Identification Success. *Systematic Biology*, 55, 715-728. <https://doi.org/10.1080/10635150600969864>.
- MEYER, C.P., PAULAY, G., (2005). DNA Barcoding: Error Rates Based on Comprehensive Sampling. *PLoS Biology*, 3, e422. <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.0030422>.
- MILLER, M.A., PFEIFFER, W., SCHWARTZ, T., (2012). The CIPRES Science Gateway: Enabling High-impact Science for Phylogenetics Researchers with Limited Resources. In Proceedings of the 1st

- Conference of the Extreme Science and Engineering Discovery Environment: Bridging from the EXtreme to the Campus and Beyond, (New York, NY, USA: ACM), 39, 1–39:8.
- MOTTERN, J.L., HERATY, J.M., (2014). Revision of the *Cales noacki* species complex (Hymenoptera, Chalcidoidea, Aphelinidae). *Systematic Entomology*, 39, 354–379. <https://doi.org/10.1111/syen.12060>.
- MUELLER, S.C., SUMMERS, C.G., GOODELL, P.B., (2003). A Field Key to the Most Common *Lygus* Species Found in Agronomic Crops of the Central San Joaquin Valley of California. Regents of the University of California Division of Agriculture and Natural Resources Publication, 12 pp.
- NOOR, M.A.F., (2002). Is the biological species concept showing its age? *Trends in Ecology & Evolution*, 17 (4), 153-154.
- O'MEARA, B.C., ANE, C., SANDERSON, M.J., WAINWRIGHT, P.C., (2006). Testing for different rates of continuous trait evolution using likelihood. *Evolution*, 60 (5), 922-933.
- OTANI, J.K., CARCAMO, H.A. (2011). Biology and management of *Lygus* in canola. *Insects and Diseases. Prairie Soils & Crops Journal* 4, 42-53.
- PALUMBO, J. C., NATWICK, E. T., (2010). The *Bagrada* bug (Hemiptera: Pentatomidae): A new invasive pest of cole crops in Arizona and California. Online. *Plant Health Progress* <https://doi.org/10.1094/PHP-2010-0621-01-BR>.
- PAREDES, A., (2006). L'intégration des étrangers dans la « république métissée »: le Mexique. *Amérique Latine Histoire et Mémoire. Les Cahiers ALHIM*, 12 <https://doi.org/10.4000/alhim.1292>.
- PATTENGAL, N.D., ALIPOUR, M., BININDA-EMONDS, O.R.P., MORET, B.M.E., STAMATAKIS, A., (2010). How Many Bootstrap Replicates Are Necessary? *Journal of Computational Biology*, 17 (3), 337-54. <https://doi.org/10.1089/cmb.2009.0179>.
- PERICART, J., (1990). Hémiptères Saldidae et Leptopodidae d'Europe Occidentale et du Maghreb. – Faune de France, vol. 77. Fédération Française des Sociétés de Sciences naturelles, Paris, 238pp.
- PERRY, K.D., BAKER, G.J., POWIS, K.J., KENT, J.K., WARD, C.M., BAXTER, S.W., (2018). Cryptic *Plutella* species show deep divergence despite the capacity to hybridize. *BMC Evolutionary Biology*, 18, 77. <https://doi.org/10.1186/s12862-018-1183-4>.
- PIEMONTESE L, GIOVANNINI, I., GUIDETTI, R., PELLEGRINI, G., DIOLI, P., MAISTRELLO, L., REBECCHI, L., CESARI, M., (2020) The species identification problem in mirids (Hemiptera: Heteroptera) highlighted by DNA barcoding and species delimitation studies. *The European Zoological Journal*, 87 (1), 310-324. <https://doi.org/10.1080/24750263.2020.1773948>.
- PM 7/98 (4) Specific requirements for laboratories preparing accreditation for a plant pest diagnostic activity, 2019. *EPPO Bulletin*, 49, 530–563. <https://doi.org/10.1111/epp.12629>.
- PONS J., BARRACLOUGH, T.G., GOMEZ-ZURITA, J., CARDOSO, A., DURAN, D.P., HAZELL, S., KAMOUN, S., SUMLIN, W.D., VOGLER, A.P., (2006). Sequence-Based Species Delimitation for the DNA Taxonomy of Undescribed Insects. *Systematic Biology*, 55 (4), 595-609. <https://doi.org/10.1080/10635150600852011>.
- PUTSHKOV, V.G., (1961). – Plant bugs (Heteroptera, Miridae) from Poltavsk Region. *Pratsi Institutu Zoologii, Kiev*, 17, 71-85.
- PUTSHKOV, V.G., (1966). Principal Miridae injurious to crops. *Naukova Dumka, Kiev*, 1-172.
- PUTSHKOV, P.V., MOULET, P., (2009). Hémiptères Reduviidae d'Europe occidentale. *Faune de France*, 92. Fédération Française des Sociétés de Sciences Naturelles, Paris, 668 pp.
- RABINOVICH, S.G., (2005). *Measurement errors and Uncertainties: Theory and Practice*, Springer, New York, 308 pp.
- RAUPACH, M.J., HENDRICH, L., KÜCHLER, S.M., DEISTER, F., MORINIERE, J., GOSSNER, M.M., (2014). Building-up of a DNA barcode library for true bugs (insecta: hemiptera: heteroptera) of Germany reveals taxonomic uncertainties and surprises. *PLOS ONE* 9 : e106940.
- RAVIGNE, V., BARBEROUSSE, A., BIERNE, N. BRITTON-DAVIDIAN, J., CAPY, P., DESDEVISES, Y., GIRAUD, T., JOUSSELIN, E. MOULIA, C., SMADJA, C., SAMADI, S., (2010). La spéciation. In : THOMAS, LEFEVRE & RAYMOND, *Biologie Evolutive de Boeck* (eds), 79-122.
- REYMONET, C., LUPOLI, R., (2017). Hybridation interspécifique naturelle viable entre *Eurydema oleracea* (L., 1758) et *E. ornata* (L., 1758) (Hemiptera Pentatomidae). *L'Entomologiste*, 73 (4), 225-233.
- RIBES, J., GAPON, D.A., PAGOLA-CARTE, S., (2007). On some species of *Carpocoris* Kolenati, 1846: new synonymies (Heteroptera: Pentatomidae: Pentatominae). *Mainzer Naturwissenschaftliches Archiv, Beiheft*, 31, 187–198.

- RIDER D. A., (2006). Family pentatomidae Leach, 1815, pp. 233–402. In Aukema B. and Rieger C. H. (eds.), *Catalogue of the Heteroptera of the Palaearctic region*. Vol. 5. Pentatomomorpha II. The Netherlands Entomological Society, Amsterdam, the Netherlands, pp. 364–374.
- RIDER D. A., (2015). Pentatomoidea home page. North Dakota State University; <http://www.ndsu.nodak.edu/ndsu/~rider/Pentatomoidea/>.
- RINALTA T. RINNE V., (2011). Suomen Luteet. Helsinki, Tibiale. 352 pp.
- ROEHRDANZ, R.L., WICHMANN, S.S., (2015). 28S Ribosomal RNA Sequences Separate Five Prominent *Lygus* (Hemiptera: Miridae) Pest Species into Three Species Clusters. *Annals of the Entomological Society of America*, 108, 211–214. <https://doi.org/10.1093/aesa/sav002>.
- ROHLF, J. F., MARCUS F., L.F., (1993). A revolution morphometrics. *Trends in Ecology & Evolution*, 8, 129–132. [https://doi.org/10.1016/0169-5347\(93\)90024-J](https://doi.org/10.1016/0169-5347(93)90024-J).
- ROQUES A., RABITSCH W., RASPLUS J.-Y., LOPEZ-VAAMONDE C., NENTWIG W. KENIS M., (2009). Alien Terrestrial Invertebrates of Europe. Chapitre 5. Daisie, Handbook of Alien Species in Europe. Springer Science and Business Media B.V. 63-79.
- ROUGERIE, R., NAUMANN, S., NÄSSIG, W.A., (2012). Morphology and Molecules Reveal Unexpected Cryptic Diversity in the Enigmatic Genus *Sinobirma* Bryk, 1944 (Lepidoptera: Saturniidae). *PLoS ONE* 7, e43920. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0043920>.
- RUGMAN-JONES, P.F., MORSE, J.G., STOUTHAMER, R., (2009). Rapid Molecular Identification of Armored Scale Insects (Hemiptera: Diaspididae) on Mexican ‘Hass’ Avocado. *Journal of Economic Entomology*, 102, 1948–1953. <https://doi.org/10.1603/029.102.0527>.
- SAMADI, S., BARBEROUSSE, A., (2006). The tree, the network, and the species. *Biological Journal of the Linnean Society*, 89, 509–521. <https://doi.org/10.1111/j.1095-8312.2006.00689.x>.
- SANNIER, D., (2019). Une nouvelle espèce de punaise découverte en France dans le département des Pyrénées-Orientales: *Eurydema* (*Eurydema*) *sea* Péricart & De la Rosa, 2004 (Heteroptera, Pentatomidae). *Les cahiers de la fondation d'entreprise pour la Biodiversité. Biotope*, 30, 1-16.
- SAULICH, A.K., MUSOLIN, D.L., (2020). Seasonal Development of Plant Bugs (Heteroptera, Miridae): Subfamily Mirinae, Tribe Mirini. *Entomological Review*, 100 (2), 135–156. <https://doi.org/10.1134/S0013873820020013>.
- SCHAEFFER, C.W., PANIZZI, A.R., (2000). Heteroptera of economic importance. CRC Press, 856 pp.
- SCHLEE, M.A., (1986). Avian Predation on Heteroptera: Experiments on the European Blackbird *Turdus m. merula* L. *Ethology*, 73, 1–18. <https://doi.org/10.1111/j.1439-0310.1986.tb00995.x>.
- SCHLICK-STEINER, B.C., STEINER, F.M., SEIFERT, B., STAUFFER, C., CHRISTIAN, E., CROZIER, R.H., (2010). Integrative Taxonomy: A Multisource Approach to Exploring Biodiversity. *Annual Review of Entomology*, 55, 421–438. <https://doi.org/10.1146/annurev-ento-112408-085432>.
- SCHUH, R.T., (2002-2013). On-line Systematic Catalog of Plant Bugs (Insecta: Heteroptera: Miridae). <http://research.amnh.org/pbi/catalog/>.
- SCHUH R.T., WEIRAUCH C., (2020). True Bugs of the World (Hemiptera: Heteroptera) – Classification and Natural History (Second Edition). Monograph Series Volume 8. Siri Scientific Press. 768 pp.
- SCHWARTZ, M. D., FOOTITT, G., (1998). Revision of the Nearctic species of the genus *Lygus* Hahn, with a review of the Palaearctic species (Heteroptera: Miridae). *Memoirs on Entomology, International*, vol. 10. Associated Publishers, Gainesville, FL. 428 pp.
- SIMON, C., FRATI, F., BECKENBACH, A., CRESPI, B., LIU, H. FLOOK, P., (1994). Evolution, weighting and phylogenetic utility of mitochondrial gene sequences and a compilation of conserved polymerase chain reaction primers. *Annals of the Entomological Society of America*, 87, 651-701.
- SINOGLOU K.B. DIOLI P., (2017). First report of caper (*Capparis spinosa*) serious infestation by *Eurydema eckerleini* in Cyclades Islands, Greece (Hemiptera: Heteroptera, Pentatomidae). *Fragmenta entomologica*, 49 (1), 65-69.
- SITES, J., MARSHALL, J.C., (2003). Delimiting species: a Renaissance issue in systematic biology. *Trends in Ecology & Evolution*, 18 (9), 462-470.
- SITES, J., MARSHALL, J., (2004). Operational criteria for delimiting species. *Annuals Review of Ecology, Evolution, and Systematics*, 35, 199-227.
- SHOKRALLA, S., SPALL, J.L., GIBSON, J.F., HAJIBABAEI, M., (2012). Next-generation sequencing technologies for environmental DNA research. *Molecular Ecology* 21, 1794–1805. <https://doi.org/10.1111/j.1365-294X.2012.05538.x>.
- SHOKRALLA, S., PORTER, T.M., GIBSON, J.F., DOBOSZ, R., JANZEN, D.H., HALLWACHS, W., GOLDING, G.B., HAJIBABAEI, M., (2015). Massively parallel multiplex DNA sequencing for

- specimen identification using an Illumina MiSeq platform. *Scientific Reports*, 5, 9687. <https://doi.org/10.1038/srep09687>.
- SKIPPER L., (2013). Danmarks blomstertæger. Ollerup: Apollo Booksellers. 407 pp.
- SLATER, J.A., (1950). An investigation of the female genitalia as taxonomic characters in the Miridae (Hemiptera). *Iowa State College Journal of Science*, 25, 1-81.
- SNODGRASS, G.L., JACKSON, R.E., PERERA, O.P., ALLEN, K.C., LUTTRELL, R.G., (2012). Effect of food and temperature on emergence from diapause in the tarnished plant bug (Hemiptera: Miridae). *Environmental Entomology*, 41 (6), 1302-1310. <https://doi.org/10.1603/EN11332>.
- SOBERON, J., (2007). Grinnellian and Eltonian niches and geographic distributions of species. *Ecology Letters*, 10, 1115–1123. <https://doi.org/10.1111/j.1461-0248.2007.01107.x>.
- SOUTHWOOD, T.R.E., LESTON, D., (1959). Land and water bugs of the British Isles. London & New York. Frederick Warne & Co.436 pp.
- SPURGEON, D.W., BRENT, C.S., (2019). Development and Survival of *Lygus hesperus* (Hemiptera: Miridae) Nymphs Under Constant and Variable Temperatures. *Journal of Insect Science*, 19 (1), 1–6. <https://doi.org/10.1093/jisesa/iez003>.
- STEWART, R.K. 1969. Species of *Lygus* (Hahn) (Hemiptera : Miridae) in Scotland. *Proceedings of the Royal Entomological Society, London (B)*, 38, 20-26.
- STICHEL W., (1955-1962). Illustrierte Bestimmungstabellen der Wanzen. II. Europa. (Hemiptera – Heteroptera Europae) 1 (1955) :1-160, (1956) : 161-168 ; 2 (1956) : 169-480, (1957) : 481-704, (1958) : 705-907 ; 3 (1958) : 1-32, (1959) : 33-192, (1960) : 193-428 ; 4 (1957) :1-96, (1958) : 97-224, (1959) : 225-384, (1960) : 385-544, (1961) : 545-768, (1962) : 769-838 ; General-Index, 1-111. Stichel, Berlin-Hermsdorf.
- STREITO, J.-C., BOUT A., (2019a). « Oh punaise » Vous avez dit punaises ! *Phytoma*, 722, 49-52.
- STREITO, J.-C., BOUT A., (2019b). Punaises phytophages, quelle diversité sur nos cultures ? *Phytoma*, 722, 53-56.
- STREITO, J.-C. GERMAIN, J.-F., sous presse. Chapitre Hemiptera. In Aberlenc H.P. (coord.) Les Insectes du Monde - Biodiversité, classification, clés de détermination des familles, 2 Tomes. Éditions MUSEO.
- STREITO J.-C., GENSON G., PIERRE É., CRUAUD A., RASPLUS J.-Y., (2018). Ten years of Heteroptera barcoding at CBGP: outputs and prospects. Communication orale, VIe IHS meeting, La Plata, Argentina 3-7 décembre 2018.
- STREITO J.-C., CHARTOIS M., PIERRE É., ROSSI J.-P., (2020). Beware the brown marmorated stink bug! *IVES Technical Reviews*. <https://doi.org/10.20870/IVES-TR.2019.3304>.
- STRONG, F.E., SBELDABL, J.A., HUGBES, P.R., HUSSEIN, M.K., (1969). Reproductive biology of *Lygus hesperus* Knight. *Hilgardia*, 40 (4), 105.
- SUEUR, J., PUISSANT, S., (2007). Similar look but different song: a new *Cicadetta* species in the montana complex (Insecta, Hemiptera, Cicadidae). *Zootaxa*, 1442, 55-68.
- SWEZEY, S.L., NIETO, D.L., HAGLER, J.R., PICKETT, C.H., BRYER, J.A., MACHTLEY, S.A., (2013). Dispersion, Distribution, and Movement of *Lygus* spp. (Hemiptera: Miridae) in Trap-Cropped Organic Strawberries. *Environmental Entomology*, 42 (4), 770-778. <http://dx.doi.org/10.1603/EN12353>.
- TASZAKOWSKI, A., PASINSKA, A., (2017). New data on the occurrence of terrestrial true bugs (Hemiptera : Heteroptera) in Pieniny Mountains. *Fragmenta Faunistica*, 60 (1),1-13.
- THIERRY, D., CLOUPEAU, R., JARRY, M., (1992). La chrysope commune *Chrysoperla carnea* sensu lato dans le centre de la France : mise en évidence d'un complexe d'espèces (Insecta: Neuroptera: Chrysopidae). Current research in Neuropterology. Proceedings of the Fourth International Symposium on neuropterology. Bagnères-de-Louchon, France, 1991. Canard, M., Aspöck, H. & Mansell M.W. (Eds.), Toulouse, France, p.379-392.
- THOMPSON JD, GIBSON TJ, PLEWNIAC F, JEANMOUGIN F, HIGGINS DG, (1997). "The CLUSTAL_X windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools". *Nucleic Acids Research*, 25 (24), 4876–4882. Doi:10.1093/nar/25.24.4876.
- TILLIER S., DE WEVER P., GROS F., DERCOURT, J., (2000). Systématique - Ordonner la diversité du Vivant. Rapport de l'Académie des sciences sur la science et la technologie, 11, 24-48.
- VAN VALEN, L., (1974). Molecular evolution as predicted by natural selection. *Journal of Molecular Evolution*, 3, 89-101.
- VELIKOVA, V., SALERNO, G., FRATI, F., PERI, E., CONTI, E., COLAZZA, S., LORETO, F., (2010). Influence of Feeding and Oviposition by Phytophagous Pentatomids on Photosynthesis of

- Herbaceous Plants. *Journal of Chemical Ecology*, 36, 629–641. <https://doi.org/10.1007/s10886-010-9801-7>.
- VINOKUROV, N. N., (1979). Heteroptera of Yakutia. *Opredeliteli po Faune SSSR*, 123, 232 pp.
- VINOKUROV, N. N. AND E. V. KANYUKOVA, (1995). Heteroptera of Siberia. Nauka, Novosibirsk, 237 pp.
- VINOKUROV N.N., GOLUB V.B., KANYUKOVA E.V., KERZHNER I.M., TSHERNOVA G.P., (1988). Homoptera and Heteroptera. In: Ler P.A. (ed.), *Keys to the identification of insects of the Soviet Far East*. Vol. 2. Nauka Leningrad, 727-930.
- WAGNER, E., (1947). *Lygus gemellalus f. autumnalis f. nov. Bombus*, 1, 183.
- WAGNER, E., (1949). Zur Systematik der Gattung *Lygus* Hhn. (Hem. Het. Miridae). *Verhandlungen des Vereins für Naturwissenschaftliche Heimatforschung zu Hamburg* 30, 26-40.
- WAGNER, E., (1950). Die Artberechtigung von *Lygus maritimus* E. Wagn. (Hem. Het. Miridae). *Entomologische Berichten, Amsterdam* 13, 87-90.
- WAGNER, E., (1952). Zur Systematik von *Psallus variabilis* Fall. (Hem. Het. Miridae). *Opuscula Entomologica*, 17, 90-94.
- WAGNER, E., (1964). Two new species of Miridae (Hemiptera, Heteroptera) from Israel. *Israel Journal of Zoology*, 13, 34-39.
- WAGNER, E., (1970-1978). Die Miridae Hahn, 1831, des Mittelmeerraumes und des Makaronesischen Inseln (Hemiptera, Heteroptera). *Entomol. Abhandl. Staatl. Mus. Tierk., Dresden* : 1, Band 37 Suppl., 1970-1971 : I-III + 1-484 ; 2, Band 39 Suppl., 1973 : I-II + 1-421 ; 3, Band 40 Suppl., 1975 : I-II + 1-483 ; avec Weber, H.H., Nachträge zu den Teilen 1-3, Band 42 Suppl., 1978 : I-II + 1-96.
- WAGNER, E., WEBER, H.H., (1964). Hétéroptères Miridae. *Faune de France* 67. Fédération Française des Sociétés de Sciences Naturelles, Paris, 593 pp.
- WANG, Y., HUANG, XL, QIAO, GX., (2013). Comparative analysis of mitochondrial genomes of five aphid species (Hemiptera: aphididae) and phylogenetic implications. *PLoS One*. 8. e77511.
- WANG, Y., LI, H, WANG, P, SONG, F, CAI, WZ., (2014). Comparative mitogenomics of plant bugs (Hemiptera: Miridae): identifying the AGG codon reassignments between Serine and Lysine. *PLoS One*. 9. e101375.
- WANG, J., ZHANG, L., ZHANG, Q.-L., ZHOU, M.-Q., WANG, X.-T., YANG, X.-Z., YUAN, M.-L., (2017). Comparative mitogenomic analysis of mirid bugs (Hemiptera: Miridae) and evaluation of potential DNA barcoding markers. *PeerJ* 5, e3661. <https://doi.org/10.7717/peerj.3661>.
- WHEELER, Q., MEIER, R., eds., (2000). *Species Concepts and Phylogenetic Theory: A Debate*. Columbia University Press, 228 pp.
- WHINNETT, A., ZIMMERMANN, M., WILLMOTT, K.R., HERRERA, N., MALLARINO, R., SIMPSON, F., JORON, M., LAMAS, G., MALLET, J., (2005). Strikingly variable divergence times inferred across an Amazonian butterfly 'suture zone.' *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, 272, 2525–2533. <https://doi.org/10.1098/rspb.2005.3247>.
- WHITWORTH, T.L., DAWSON, R.D., MAGALON, H., BAUDRY, E., (2007). DNA barcoding cannot reliably identify species of the blowfly genus *Protocalliphora* (Diptera: Calliphoridae). *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, 274, 1731–1739. <https://doi.org/10.1098/rspb.2007.0062>.
- WIEMERS, M., FIEDLER, K., (2007). Does the DNA barcoding gap exist? – a case study in blue butterflies (Lepidoptera: Lycaenidae). *Frontiers in Zoology*, 4, 8. <https://doi.org/10.1186/1742-9994-4-8>.
- WILSON, A.R., Ed., (1999). *Species: new interdisciplinary essays*. Lavoisier S.A.S, 349 pp.
- WYNDE, F.J.H., PORT, G.R., (2012) The Use of Olfactory and Visual Cues in Host Choice by the Capsid Bugs *Lygus rugulipennis* Poppius and *Liocoris tripustulatus* Fabricius. *PLoS ONE* 7(12): e46448. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0046448>.
- YAMAKAWA, A.Y., IMAI, H., (2013). PCR-RFLP typing reveals a new invasion of Taiwanese Meretrix (Bivalvia: Veneridae) to Japan. *Aquatic Invasions*, 8, 407–415.
- YASUNAGA T., SCHWARTZ M.D., CHEROT F., (2018). Review of the plant bug genus *Prolygus* and related mirine taxa from eastern Asia (Hemiptera: Heteroptera: Miridae). *Acta Entomologica Musei Nationalis Pragae*, 58 (2), 357-388.
- YU, S., WANG, Y., REDEI, D., XIE, Q., BU, W., (2013). Secondary structure models of 18S and 28S rRNAs of the true bugs based on complete rDNA sequences of *Eurydema maracandica* Oshanin, 1871 (Heteroptera, Pentatomidae). *Zookeys*, 319, 363–377. <https://doi.org/10.3897/zookeys.319.4178>.

- YUAN, M.-L., ZHANG, Q.-L., GUO, Z.-L., WANG, J., SHEN, Y.-Y., (2015). Comparative mitogenomic analysis of the superfamily Pentatomoidea (Insecta: Hemiptera: Heteroptera) and phylogenetic implications. *BMC Genomics* 16. <https://doi.org/10.1186/s12864-015-1679-x>.
- ZHANG, Z.-Q., (2013). Phylum Arthropoda. In : Zhang, Z.-Q. (Ed.) Animal Biodiversity: An Outline of Higher-level Classification and Survey of Taxonomic Richness (Addenda 2013). *Zootaxa*, 3703, 17–26. <https://doi.org/10.11646/zootaxa.3703.1.6>.
- ZHANG, L.-J., CAI, W.-Z., LUO, J.-Y., ZHANG, S., WANG, C.-Y., LV, L.-M., ZHU, X.-Z., WANG, L., CUI, J.-J., (2017). Phylogeographic patterns of *Lygus pratensis* (Hemiptera: Miridae): Evidence for weak genetic structure and recent expansion in northwest China. *PLoS One*, 12. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0174712>.
- ZHANG, Y.M., BASS, A.I.H., FERNANDEZ, D.C., SHARANOWSKI, B.J., (2018). Habitat or temporal isolation: Unraveling herbivore–parasitoid speciation patterns using double digest RADseq. *Ecology and Evolution*, 8, 9803–9816. <https://doi.org/10.1002/ece3.4457>.
- ZHAO, Y.E., WANG, Z.H., XU, Y., WU, L.P., HU, L., (2013). Secondary structure prediction for complete rDNA sequences (18S, 5.8S, and 28S rDNA) of *Demodex folliculorum*, and comparison of divergent domains structures across Acari. *Experimental Parasitology*, 135 (2), 370-81. <https://doi.org/10.1016/j.exppara.2013.07.025>.
- ZHAO W., ZHAO Q., LI M., WEI J., ZHANG X., ZHANG H., (2017a). Characterization of the complete mitochondrial genome and phylogenetic implications for *Eurydema maracandica* (Hemiptera: Pentatomidae). *Mitochondrial DNA, Part B*, 2(2), 550–551.
- ZHAO W., ZHAO Q., LI M., WEI J., ZHANG X., AND ZHANG H., (2017b). DNA Barcoding of Chinese species of the genus *Eurydema* Laporte, 1833 (Hemiptera: Pentatomidae). *Zootaxa*, 4286, 151–175.
- ZHAO, W., ZHAO, Q., LI, M., WEI, J., ZHANG, X., ZHANG, H., (2019). Comparative Mitogenomic Analysis of the *Eurydema* Genus in the Context of Representative Pentatomidae (Hemiptera: Heteroptera) Taxa. *Journal of Insect Science*, 19, 20. <https://doi.org/10.1093/jisesa/iez122>.
- ZHENG, L.-Y., Yu, C., (2004). Notes on Chinese species of *Lygus* (s. str.) Hahn with descriptions of three new species (Hemiptera : Miridae). - *Acta Zootaxonomica Sinica*, 17, 352-359.
- ZHOU, C., KANDEMIR, I., WALSH, D.B., ZALOM, F.G., LAVINE, L.C., (2012). Identification of *Lygus hesperus* by DNA Barcoding Reveals Insignificant Levels of Genetic Structure among Distant and Habitat Diverse Populations. *PLoS One*, 7. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0034528>.
- ZUNIGA-REINOSO, A., BENITEZ, H.A., (2015). The overrated use of the morphological cryptic species concept: An example with *Nyctelia* darkbeetles (Coleoptera: Tenebrionidae) using geometric morphometrics. *Zoologischer Anzeiger*, 255, 47–53. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jcz.2015.01.004>.

Annexe 1

Tableau des espèces étudiées avec localité

Genre	Sous-Genre	Espèce	ID	Localité
Eurydema	Eurydema	eckerleini	JSTR05910_0101	Grece
			JSTR05911_0101	Grece
		gebleri	JSTR00009_2101	Chine
			JSTR00009_2102	Chine
			JSTR00009_2103	Chine
		herbacea	JSTR02119_0101	France
			JSTR02119_0102	France
			JSTR02119_0103	France
		lundbaldi	JSTR05913_0101	Espagne
			JSTR05914_0101	Espagne
			JSTR05915_0101	Espagne
		nigriceps	JSTR05257_0101	Maroc
			JSTR05257_0102	Maroc
		oleracea	JSTR00440_1701	France
			JSTR00471_2401	France
			JSTR00669_0601	France
			JSTR02122_0101	France
			JSTR04068_0101	France
			JSTR05011_0101	France
			JSTR05011_0102	France
			JSTR05057_0102	France
			JSTR05646_0101	France
			JSTR06080_0101	France
			JSTR06080_0102	France
			JSTR06080_0103	France
			JSTR06268_0101	France
			JSTR06309_0101	France
			JSTR06335_0101	France
			JSTR06335_0102	France
			JSTR06574_0101	France
		JSTR06576_0101	France	
		JSTR06577_0101	France	

		JSTR07039_0101	France
		JSTR07820_0101	France
		JSTR07912_0101	France
	ornata	JSTR00126_0301	France
		JSTR02943_0101	France
		JSTR02943_0102	France
		JSTR02943_0103	France
		JSTR00199_1101	France
		JSTR00296_0201	Espagne
		JSTR00348_2101	Grece
		JSTR00365_0201	Crete
		JSTR00365_0202	Crete
		JSTR00365_0203	Crete
		JSTR00365_0204	Crete
		JSTR00440_1601	France
		JSTR00471_3101	France
		JSTR02088_0101	France
		JSTR02999_0101	France
		JSTR03041_0101	France
		JSTR04192_0101	Maroc
		JSTR04209_0101	Maroc
		JSTR04233_0101	Maroc
		JSTR04406_0101	France
		JSTR04031_0101	France
		JSTR04031_0102	France
		JSTR04468_0101	Espagne
		JSTR04468_0102	Espagne
		JSTR05057_0101	France
		JSTR05250_0101	France
		JSTR05258_0101	Maroc
		JSTR05258_0102	Maroc
		JSTR05593_0101	France
		JSTR07053_0101	France
		JSTR07053_0102	France
		JSTR07063_0101	France
		JSTR07617_0101	France
	JSTR07617_0102	France	

		JSTR07809_0101	Espagne
	sea	JSTR07809_0102	Espagne
		JSTR07809_0103	Espagne
		JSTR05912_0101	Espagne
Horvatheurydema	fieberi	JSTR08381_0101	
		JSTR08381_0102	
		JSTR08381_0103	
		JSTR08381_0104	
		JSTR05916_0101	Espagne
		JSTR05917_0101	Espagne
		JSTR05918_0101	Espagne
		JSTR06847_0101	Grece
		JSTR06848_0101	Grece
		JSTR06850_0101	Grece
	JSTR06956_0101	France	
	rotundicollis	JSTR00169_0501	France
		JSTR06842_0101	France
		JSTR06957_0101	France
JSTR08120_0101		France	
Rubrodosalium	cyanea	JSTR04692_0101	France
		JSTR04685_0101	France
		JSTR04685_0102	France
		JSTR07896_0101	France
		JSTR07896_0102	France
		JSTR07896_0103	France
		JSTR08044_0101	France
		JSTR08044_0102	France
		JSTR08044_0103	France
		JSTR08061_0101	France
	JSTR08063_0102	France	
	dominulus	JSTR00012_0301	Chine
		JSTR00012_0302	Chine
		JSTR00012_0304	Chine
		JSTR05049_0101	France
		JSTR07967_0101	France
		JSTR07967_0102	France
		JSTR07967_0103	France

			JSTR07967_0104	France
			JSTR08054_0101	France
			JSTR08054_0102	France
			JSTR08063_0101	France
			JSTR08383_0101	
			JSTR08385_0101	
			JSTR06958_0101	France
			JSTR08101_0101	France
			JSTR08101_0102	France
			JSTR06841_0101	France
		cyanea/dominulus	JSTR08062_0101	France
		spectabilis	JSTR00365_0101	Grece
			JSTR00364_0901	Grece
			JSTR00364_0902	Grece
			JSTR00364_0903	Grece
			JSTR00366_0101	Grece
			JSTR00366_0102	Grece
		ventralis	JSTR00270_0101	France
			JSTR04380_0101	France
			JSTR04391_0101	France
			JSTR03087_0101	France
			JSTR03087_0102	France
			JSTR04468_0201	Espagne
			JSTR04468_0202	Espagne
			JSTR04468_0301	Espagne
			JSTR05070_0101	France
			JSTR05594_0101	France
			JSTR07757_0101	France
Bagrada		qinlingensis	KY206849.1	Chine
			KY206850.1	Chine
		hilaris	JSTR00605_0701	France
			JSTR00623_1001	France
			JSTR01844_0101	USA
			JSTR01844_0102	USA
			JSTR01844_0103	USA
			JSTR00605_0702	France
			JSTR00605_0703	France

			JSTR00605_0704	France
			JSTR06021_0101	USA
			JSTR06021_0102	USA
			JSTR06024_0101	Afrique du Sud
			JSTR06024_0102	Afrique du Sud
			JSTR07874_0103	Chili
			JSTR07874_0104	Chili
		amoenula	JSTR05237_0101	Maroc
			JSTR05241_0101	Maroc
		stolata	KY206851.1	Chine
			KX262794.1	Chine
Murgantia		histrionica	JSTR00749_0701	USA
			JSTR00749_0702	USA
			JSTR00749_0703	USA
			JSTR00749_0704	USA
			JSTR00749_0705	USA
		bifasciata	JSTR05796_0102	Equateur
Trochiscocoris		hemipterus	JSTR07808_0101	
Eysarcoris		ventralis	EPIE00052_0201	France
			JSTR01033_0101	Afrique du Sud

Annexe 2

Tableau des espèces étudiées avec la localité

	Espèces étudiées	ID pris	Numéro Biologics	Localité
Espèces Européennes	<i>L. gemellatus</i>	JSTR00270_1402	90652	Alpes de Haute Provence
		JSTR00296_0601	17468	Ameria Espagne
		JSTR00329_0801	90653	Hérault
		JSTR00669_0201	90661	Hérault
		JSTR00699_0501	55292	Bouches du Rhône
		JSTR02199_0101	73766	Bouches du Rhône
		JSTR03391_0102	90727	Alpes de Haute Provence
		JSTR04405_0101	90749	Bouches du Rhône
		JSTR04971_0101	103848	Hérault
		JSTR05209_0101	103856	Hérault
		JSTR05259_0101	89133	Alpes de Haute Provence
	JSTR05526_0101	103859	Pyrénées Orientales	
	<i>L. italicus</i>	JSTR03732_0101	90739	Corse du Sud
		EPIE00836_0101	122567	Corse
		EPIE00836_0102	122568	Corse
		EPIE00836_0103	122569	Corse
		JSTR05140_0101	91342	Haute Corse
		JSTR05140_0102	103853	Haute Corse
	<i>L. maritimus</i>	JSTR07038_0101	116058	Côtes d'Armor
		JSTR07038_0102	116059	Côtes d'Armor
		JSTR00283_0601	17396	Aude
		JSTR02049_0101	90704	Manche
		JSTR02049_0102	90705	Manche
		JSTR02115_0101	90707	Loire Atlantique
		JSTR02123_0101	90708	Loire Atlantique
		JSTR02131_0101	90709	Côtes d'Armor
	<i>L. pratensis</i>	JSTR00203_0101	17008	Indre et Loire
		JSTR00440_0801	90658	Indre et Loire
		JSTR00469_0301	52612	Indre et Loire
		JSTR00699_0101	55286	Bouches du Rhône
		JSTR01971_0101	105238	Bouches du Rhône
		JSTR02001_0101	90703	Manche
		JSTR02198_0101	73765	Bouches du Rhône
		JSTR02966_0101	90722	Haute Corse
		JSTR03125_0101	90724	Corse du Sud
		JSTR05071_0101	103851	Corrèze
		JSTR05201_0101	103855	Lot et Garonne
		JSTR05260_0101	89135	Gard
		JSTR05260_0102	89136	Gard

Espèces américaines		JSTR05535_0101	103863	Pyrénées Orientales
	<i>L. wagneri</i>	JSTR04652_0101	87479	Pyrénées Atlantiques
		JSTR04652_0105	90756	Pyrénées Atlantiques
		JSTR05527_0101	103860	Pyrénées Orientales
		JSTR05533_0101	103861	Aude
		JSTR05533_0102	103862	Aude
	<i>L. punctatus</i>	JSTR00134_0501	16658	Alpes Maritimes
		JSTR00176_0603	16823	Alpes Maritimes
		JSTR00269_0801	17223	Alpes de Haute Provence
		JSTR00275_0801	17344	Alpes de Haute Provence
		JSTR03365_0101	90725	Alpes de Haute Provence
		JSTR03391_0201	90729	Alpes de Haute Provence
	<i>L. rugulipennis</i>	JSTR00119_0602	90649	Loir et Cher
		JSTR00119_0603	90650	Loir et Cher
		JSTR00431_0501	90657	Lozère
		JSTR00458_0502	53402	Hautes Alpes
		JSTR00458_0503	53403	Hautes Alpes
		JSTR02077_0101	90706	Manche
		JSTR03405_0101	90730	Alpes de Haute Provence
		JSTR03424_0101	90734	Alpes de Haute Provence
		JSTR04652_0102	87480	Pyrénées Atlantiques
		JSTR04652_0104	87482	Pyrénées Atlantiques
		JSTR04664_0201	90757	Pyrénées Atlantiques
		JSTR04684_0101	90758	Pyrénées Atlantiques
		JSTR05032_0101	103850	Aveyron
		JSTR05196_0101	89064	Lot et Garonne
		JSTR05315_0101	90855	Lot et Garonne
		JSTR05316_0101	90856	Lot et Garonne
		JSTR05560_0101	105253	Gard
		JSTR05582_0101	103866	Gard
	JSTR05588_0101	103869	Gard	
	<i>L. indéterminé</i>	JSTR03797_0101	90744	Pyrénées Orientales
	<i>L. vanduzeei</i>	JSTR00730_0801	90664	West Virginia
JSTR00730_0802		103831	West Virginia	
JSTR00730_0803		103832	West Virginia	
JSTR00736_0401		90673	West Virginia	
<i>L. lineolaris</i>	JRAS03323_0301	8798	Nebraska	
	JRAS03338_0304	8809	Wisconsin	
	JRAS03348_0101	8814	Indiana	
	JRAS03348_0103	8816	Indiana	
	JRAS03382_0102	8818	North Carolina	
	JSTR00310_0301	17512	Quebec	
	JSTR00734_0301	90669	West Virginia	
	JSTR00742_0501	57295	Virginia	
JSTR00754_0301	90677	District of Columbia		
<i>L. elisus</i>	JRAS03286_0402	8789	Idaho	

	<i>L. bradleyi</i>	JRAS03286_0403	8790	Idaho
		JRAS03286_0405	8792	Idaho
		JSTR01749_0101	90697	California
		JSTR01749_0102	103834	California
		JSTR01749_0104	122570	California
		JSTR01749_0105	122571	California
Outgroup	<i>Apolygus lucorum</i>	JSTR00272_0801	17318	
	<i>Orthops campestris</i>	JSTR00269_1102	17228	

Tableau 2 : Liste des individus ayant servi aux différents tests de marqueurs moléculaires

JSTR00270_1402	<i>L. gemellatus</i>
JSTR00699_0501	<i>L. gemellatus</i>
JSTR02049_0102	<i>L. maritimus</i>
JSTR05140_0101	<i>L. italicus</i>
JSTR00203_0101	<i>L. pratensis</i>
JSTR00469_0301	<i>L. pratensis</i>
JSTR00699_0101	<i>L. pratensis</i>
JSTR00134_0501	<i>L. punctatus</i>
JSTR00275_0801	<i>L. punctatus</i>
JSTR03365_0101	<i>L. punctatus</i>
JSTR04652_0105	<i>L. wagneri</i>
JSTR02077_0101	<i>L. rugulipennis</i>
JSTR04684_0101	<i>L. rugulipennis</i>
JSTR00310_0301	<i>L. lineolaris</i>
JRAS03348_0103	<i>L. lineolaris</i>
JSTR00132_0101	<i>Adelphocoris lineolatus</i>

Tableau 3 : Liste des amorces PCR utilisées pour la première amplification (MiSeq sequencing) basées sur les publications de Cruaud et al., (2017) et Shokralla et al., (2012)

Primer name	Sequence 5' - 3'
LCO1490_v0	TCGTCGGCAGCGTCAGATGTGTATAAGAGACAGGGTCAACAAATCATAAAGATATTGG
LCO1490_v1	TCGTCGGCAGCGTCAGATGTGTATAAGAGACAGCGGTCAACAAATCATAAAGATATTGG
LCO1490_v2	TCGTCGGCAGCGTCAGATGTGTATAAGAGACAGACGGTCAACAAATCATAAAGATATTGG
LCO1490_v3	TCGTCGGCAGCGTCAGATGTGTATAAGAGACAGGACGGTCAACAAATCATAAAGATATTGG
III_C_R_v0	GTCTCGTGGGCTCGGAGATGTGTATAAGAGACAGGGIGGRTAIACIGTTCAICC
III_C_R_v1	GTCTCGTGGGCTCGGAGATGTGTATAAGAGACAGCGGIGGRTAIACIGTTCAICC
III_C_R_v2	GTCTCGTGGGCTCGGAGATGTGTATAAGAGACAGGCGGIGGRTAIACIGTTCAICC
III_C_R_v3	GTCTCGTGGGCTCGGAGATGTGTATAAGAGACAGAGGGGIGGRTAIACIGTTCAICC
III_B_F_v0	TCGTCGGCAGCGTCAGATGTGTATAAGAGACAGCCIGAYATRGCIITYCCIG

III_B_F_v1	TCGTCGGCAGCGTCAGATGTGTATAAGAGACAGCCCGAYATRCICITYCCICG
III_B_F_v2	TCGTCGGCAGCGTCAGATGTGTATAAGAGACAGACCCIGAYATRCICITYCCICG
III_B_F_v3	TCGTCGGCAGCGTCAGATGTGTATAAGAGACAGGACCCIGAYATRCICITYCCICG
HCO2198_v0	GTCTCGTGGGCTCGGAGATGTGTATAAGAGACAGTAACTTCAGGGTGACCAAAAAATCA
HCO2198_v1	GTCTCGTGGGCTCGGAGATGTGTATAAGAGACAGCTAACTTCAGGGTGACCAAAAAATCA
HCO2198_v2	GTCTCGTGGGCTCGGAGATGTGTATAAGAGACAGGCTAACTTCAGGGTGACCAAAAAATCA
HCO2198_v3	GTCTCGTGGGCTCGGAGATGTGTATAAGAGACAGAGGTAACCTTCAGGGTGACCAAAAAATCA

Tableau 4 : Résumé des données générées par le séquençage d'une librairie.

sample_code	genus	species	country	barcodeP1	barcodeP2	nb_reads_processradtags	nb_reads_purified	%clone_reads	nb loci par samples	nb de locus homozygote	nbloci_cstacks(M2n6) catalog.matrix.tsv.summary
JSTR00119_0803	Lygus	rugulipennis	France	AAGGG	ACCTAT	10330911	0	100			
JSTR04972_0101	Lygus	pratensis	France	ACAAT	ACCTAT	16948884	0	100			
JSTR00283_0801	Lygus	maritimus	France	CGGAC	ACCTAT	1340423	376909	71,88133895	26102	10371	24747
JSTR03366_0101	Lygus	punctatus	France	CTAGA	ACCTAT	25864849	0	100			
JSTR00736_0401	Lygus	american	USA	GATAA	ACCTAT	7259015	0	100			
JSTR05259_0101	Lygus	gemellatus	France	GCCGC	ACCTAT	3118424	894823	71,30528113	73910	27353	69053
JSTR05259_0102	Lygus	wagneri	France	TGTGT	ACCTAT	26418266	0	100			
EPIED0836_0103	Lygus	italicus	France	TTCAG	ACCTAT	7361363	0	100			
JSTR05196_0101	Lygus	rugulipennis	France	AAGGG	TAGGTCT	36123440	0	100			
JSTR05260_0101	Lygus	pratensis	France	ACAAT	TAGGTCT	21862155	0	100			
JSTR02049_0102	Lygus	maritimus	France	CGGAC	TAGGTCT	27045995	0	100			
JSTR00269_0801	Lygus	punctatus	France	CTAGA	TAGGTCT	12024083	0	100			
JSTR01749_0101	Lygus	bradleyi	USA	GATAA	TAGGTCT	4518667	1517455	66,41808303	134944	55389	125574
JSTR07979_0101	Lygus	gemellatus	France	GCCGC	TAGGTCT	6411628	1999224	68,81877738	150962	64478	137601
JSTR05533_0101	Lygus	wagneri	France	TGTGT	TAGGTCT	1603408	538073	66,44191622			
JSTR05140_0101	Lygus	italicus	France	TTCAG	TAGGTCT	6426842	0	100			
JSTR05315_0101	Lygus	rugulipennis	France	AAGGG	CGTACT	39943979	0	100			
JSTR04408_0101	Lygus	pratensis	France	ACAAT	CGTACT	26048493	0	100			
JSTR02131_0101	Lygus	maritimus	France	CGGAC	CGTACT	11239293	0	100			
JSTR00176_0801	Lygus	punctatus	France	CTAGA	CGTACT	361078	142788	60,45508173	6019	3144	5620
JRA903323_0301	Lygus	lineolaris	USA	GATAA	CGTACT	3467439	1355206	60,91622664	133183	54506	126989
JSTR03732_0101	Lygus	gemellatus	France	GCCGC	CGTACT	2545341	995601	60,88535878	90637	39160	85438
JSTR04652_0101	Lygus	wagneri	France	TGTGT	CGTACT	11247931	0	100			
EPIED0836_0102	Lygus	italicus	France	TTCAG	CGTACT	5133625	0	100			
JSTR05582_0101	Lygus	rugulipennis	France	AAGGG	GTACGAT	24979717	0	100			
JSTR05201_0101	Lygus	pratensis	France	ACAAT	GTACGAT	34215658	0	100			
GGEN0001_0101	Lygus	maritimus	France	CGGAC	GTACGAT	5932794	1461164	75,37140174	109329	47169	108171
JSTR03405_0201	Lygus	punctatus	France	CTAGA	GTACGAT	12094424	2924214	75,82180019	168693	88292	155579
JSTR00272_0801	Lygus	outgroup	France	GATAA	GTACGAT	898726	229758	74,43514486	16267	6062	15963
JSTR00329_0801	Lygus	gemellatus	France	GCCGC	GTACGAT	8622355	0	100			
JSTR04652_0105	Lygus	wagneri	France	TGTGT	GTACGAT	6728727	1634576	75,7075001	107008	45270	96502
JSTR05140_0102	Lygus	italicus	France	TTCAG	GTACGAT	1599910	399877	75,0062816	31099	11571	29334
						409717843	14469668				

Annexe 3

Protocole de travail sous Adobe Photoshop CS6 pour homogénéiser les photos pour analyses morphométriques

-Ouvrir la photo à travailler dans Adobe Photoshop

-Faire une copie de la photo. Image Dupliquer

Préparation pour analyses morphométriques par points homologues

-Faire une rotation de l'image si nécessaire. Image Rotation de l'image 90°horaire

-Utiliser un repère vertical dans mon cas pour ensuite préparer les photos pour les analyses morphométriques. Affichage nouveau repère vertical OK

-Déplacer ce repère de manière à avoir un axe de symétrie bilatérale.

-si ce repère n'est pas bien centré, faire des rotations de l'image personnalisée

Enregistrer l'ensemble sous un format .jpeg.

Préparation pour Analyses morphométriques de contour

-Sélectionner la zone d'étude du contour Sélection Récupérer sélection OK (il faut que cela soit l'outil rectangle de sélection qui soit actif » Attention il faut que la taille de la sélection soit identique d'une photo à une autre !!

-Copier la zone sélectionnée dans un nouveau fichier, le nommer et l'enregistrer.

-Ensuite, l'outil « Lasso » est nécessaire pour sélectionner la partie étudiée pour les analyses morphométriques de contour. Ctrl C fichier nouveau OK Ctrl V.

-Renommer ce nouveau fichier.

-Ensuite, cette forme est mise en noir sur fond blanc et sauvegardée en format .jpeg pour les analyses sous R Clic droit Contour Epaisseur 5px couleur noire OK

Annexe 4 : Script points homologues

Exemple pris sur le modèle *Eurydema*

```
#Etude des points sur les Eurydema. On a 15 points à poser.
```

```
#digitalisation de landmarks (points homologues) sur les Eurydema
```

```
#charger le répertoire de travail
```

```
setwd("~/EPHE_TD_TP_sous_R/Eurydema")
```

```
#charger les packages nécessaires
```

```
library(StereoMorph)
```

```
library(geomorph)
```

```
# digitalisation des points. Pour ce faire, il faut les photos par fichiers individuels en .jpeg. il faut un fichier texte recensant le nombre de points à poser sur les photos.
```

```
digitizeImages (image.file = 'eurydema_points', shapes.file = 'Eurydema_pts.tps', landmarks.ref = 'lds_eury.txt')
```

```
coords <- readShapes(file = 'Eurydema_pts.tps')
```

```
str(coords)
```

```
#Mes images ont un axe de symétrie bilatérale. Les points en symétrie sont d'un côté et les autres de l'autre
```

```
land.pairs <- matrix(c(1,3,5,7,9,11,14, 2,4,6,8,10,12,15), ncol = 2)
```

```
ind <- dimnames(coords$landmarks.scaled)[[3]]
```

```
out <- bilat.symmetry(coords$landmarks.scaled, object.sym = TRUE, land.pairs = land.pairs, ind = ind)
```

```
shape <- out$symm.shape
```

```
#Regard sur la répartition par espèces et pour les E. ornata j'ai fait deux groupes (France et Grèce) et (Espagne et Maroc). 1 cyanea, 2 dominulus, 3 ornata France, 4 ornata Maroc.
```

```
plotAllSpecimens(shape)
```

```
grp <- c(1, 1, 1, 1, 1, 1, 2, 2, 2, 2, 3, 3, 2, 2, 2, 2, 2, 2, 2, 2, 2, 2, 2, 2, 2, 2, 2, 2, 2, 2, 2, 2, 2, 2, 3, 3, 3, 3, 3, 3, 2, 2, 3, 3, 3, 3, 4, 4, 4, 4, 4, 4, 1, 1, 2, 2, 2, 2)
```

```
plotTangentSpace(shape, groups = grp)
```

```
tgCoord <- two.d.array(shape)
```

```
pca <- prcomp(tgCoord)
```

```
plot(pca$x, type = 'n')
```

```
text(pca$x, labels = grp)
```

De la même manière, j'ai regardé si le sexe donne une répartition différente en fonction des groupes déjà faits

De la même manière, j'ai changé les positions des différents points

#J'ai fait une analyse sur uniquement les *E. cyanea* et les *E. dominulus* en augmentant le nombre d'échantillons pour voir s'il existe une différence

Analyse sur uniquement les *E. ornata* en différenciant mâle et femelle

Le même script a été utilisé sur les photos de *Lygus*.

Annexe 5 : Script R pour analyse de contour

#Analyse du contour des pronotums des *Lygus* males. 66 photos.

#Ce script m'a permis de découvrir le package momocs que l'on avait juste abordé en cours de morphométrie de l'évolution mais pas du tout utilisé. Je me suis basée sur le TP5 de Sébastien Couette et de l'essai qu'il m'a envoyé par mail.

#Je commence par installer le package Momocs.

```
library(Momocs)
```

#je vais appeler l'objet prono pour ensuite travailler sur cet objet. Momocs travaille avec des objets coo. Je dois convertir mes fichiers en jpeg. Préparation de mon fichier. Mes photos sont en noir et blanc et toutes mises sur le même repère orthonormé. Le points 0 est à gauche de ma photo.

```
dire<-c("~/EPHE_TD_TP_sous_R/contour_pronotum/prono_male_forme")
```

```
setwd(dire)
```

```
img1<-list.files(path=~"/EPHE_TD_TP_sous_R/contour_pronotum/prono_male_forme", pattern = ".jpg")
```

```
print(img1)
```

```
prono<-import_jpg(img1)
```

#c'est ici que l'on choisit de travailler sur des contours fermés et donc que l'on fait un objet Coo avec la fonction Out

```
prono = Out(prono)
```

```
coo_plot(prono[1])      #la forme 1 se dessine avec cette formule
```

```
pile(prono)            #Toutes les formes sont ensemble mais pas centrées
```

```
coo_plot(coo_center(prono[1]))          # Centrage et scaler les données
```

```
stack(prono)
```

```
stack(coo_center(pile(prono)))
```

```
coo_centre(prono)
```

```
stack(coo_center(prono))
```

```
coo_oscillo(prono[1], "efourier")      #décomposition du contour de la photo 1 et 18 en exemple
```

```
coo_oscillo(prono[18], "efourier")
```

#Analyse de Fourier sur un exemple de 10 harmoniques. Le calcul du bon nombre d'harmonique se fera ensuite.

```
prono.f<-efourier(prono, nb.h=10)
```

```
prono.f
```

#ensuite, je fais l'ACP et j'ai demandé de l'aide pour mettre des couleurs. Je me sers de la formule #spec.f=as.factor(spec)

```
prono.p<-PCA(prono.f) #sans couleur
```

```
spec.f=as.factor(spec) #pour mettre les couleurs sur les points.
```

```
prono.p<-PCA(prono.f, fac=spec.f)
```

```
plot(prono.p, col =c("red","green", "yellow", "blue", "black", "grey"))
```

#Mise de l'ACP en tant qu'objet pour pouvoir les ploter

```
class(prono.p)
```

```
plot(prono.p)
```

#Dans un script, j'ai déterminé 7 harmoniques pour avoir 99% de la forme. L'estimation du nombre d'itérations qu'il faut pour faire une analyse Fourier. Estimation du nombre d'harmoniques, basée sur l'écart au contour.

```
calibrate_reconstructions_efourier(prono, id = 66, range = 1:12)
```

```
calibrate_harmonicpower_efourier(prono, id = 1:length(prono), nb.h = 24, drop = 1, thresh = c(90, 95, 99, 99.9), plot = TRUE)
```

#J'ai pris 10 harmoniques ce qui me donnera un résultat à 99.7% de la forme initiale, ce qui est beaucoup !

#j'ai essayé de changer les axes pour voir si cela changeait et si j'obtenais une valeur propre plus grande « Eigen value » plus grand.

```
plot(prono.p, xax=2 , yax =3, col =c("red","green", "yellow", "blue", "black", "grey"))
```

```
plot(prono.p, xax=3 , yax =4, col =c("red","green", "yellow", "blue", "black", "grey"))
```

Je voulais voir si j'arriverai à trouver d'autres paramètres qui puisse me permettre de caractériser et différencier les 7 espèces.

```
coo_perimpts(prono) pas nécessaire du tout!!!!
```

#je fais un dossier avec toutes les photos sans *L. gemellatus*. Il va s'appeler prono_male_forme_ss_gem.
Je fais l'ensemble de l'analyse.

#je fais un dossier avec toutes les photos sans *L. pratensis*. Il va s'appeler prono_male_forme_ss_prat.
Je fais l'ensemble de l'analyse.

#je fais un dossier avec toutes les photos sans *L. punctatus*. Il va s'appeler prono_male_forme_ss_punct.
Je fais l'ensemble de l'analyse.

#je fais un dossier avec toutes les photos sans *L. rugulipennis*. Il va s'appeler prono_male_forme_ss_rugu. Je fais l'ensemble de l'analyse.

#je fais un dossier avec toutes les photos sans *L. wagneri*. Il va s'appeler prono_male_forme_ss_wag. Je fais l'ensemble de l'analyse.

#je fais un dossier avec toutes les photos sans *L. italicus*. Il va s'appeler prono_male_forme_ss_ita. Je fais l'ensemble de l'analyse.

#je fais un dossier avec toutes les photos sans *L. maritimus*. Il va s'appeler prono_male_forme_ss_mari.
Je fais l'ensemble de l'analyse.

#je vais réduire le nombre d'harmoniques à 5 pour voir si le groupe gem/mari et ita se regroupe sur un endroit voir si le groupe prat/punct et wagneri pareil et voir si j'ai un 3eme groupe avec rugulipennis

je vais maintenant attribuer les numéros aux différents points en utilisant la même méthode

#J'ai donc deux groupes bien distincts de points. Cela semble être les deux générations du cycle biologique : printemps et été. Je vais regarder si à l'intérieur d'un groupe j'ai une structuration en utilisant le même script.

#dans un premier temps dans le groupe A : prono_male_forme_grA

#dans un second temps dans le groupe B : prono_male_forme_grB

au sein des 2 groupes, je vais voir où se situe les espèces et les échantillons dans un premier temps à l'intérieur du groupe A.

#je vais faire la même chose pour le groupe B qui regroupe le maximum d'individus de l'espèce *L. pratensis*

Annexe 6 : *Eurydema* arbre phylogénétique en NJ

COI



Figure 1 arbre phylogénétique reconstruit à partir de l'ensemble des séquences COI en NJ (K2P) avec 1000 répliquats de bootstrap

Cytb

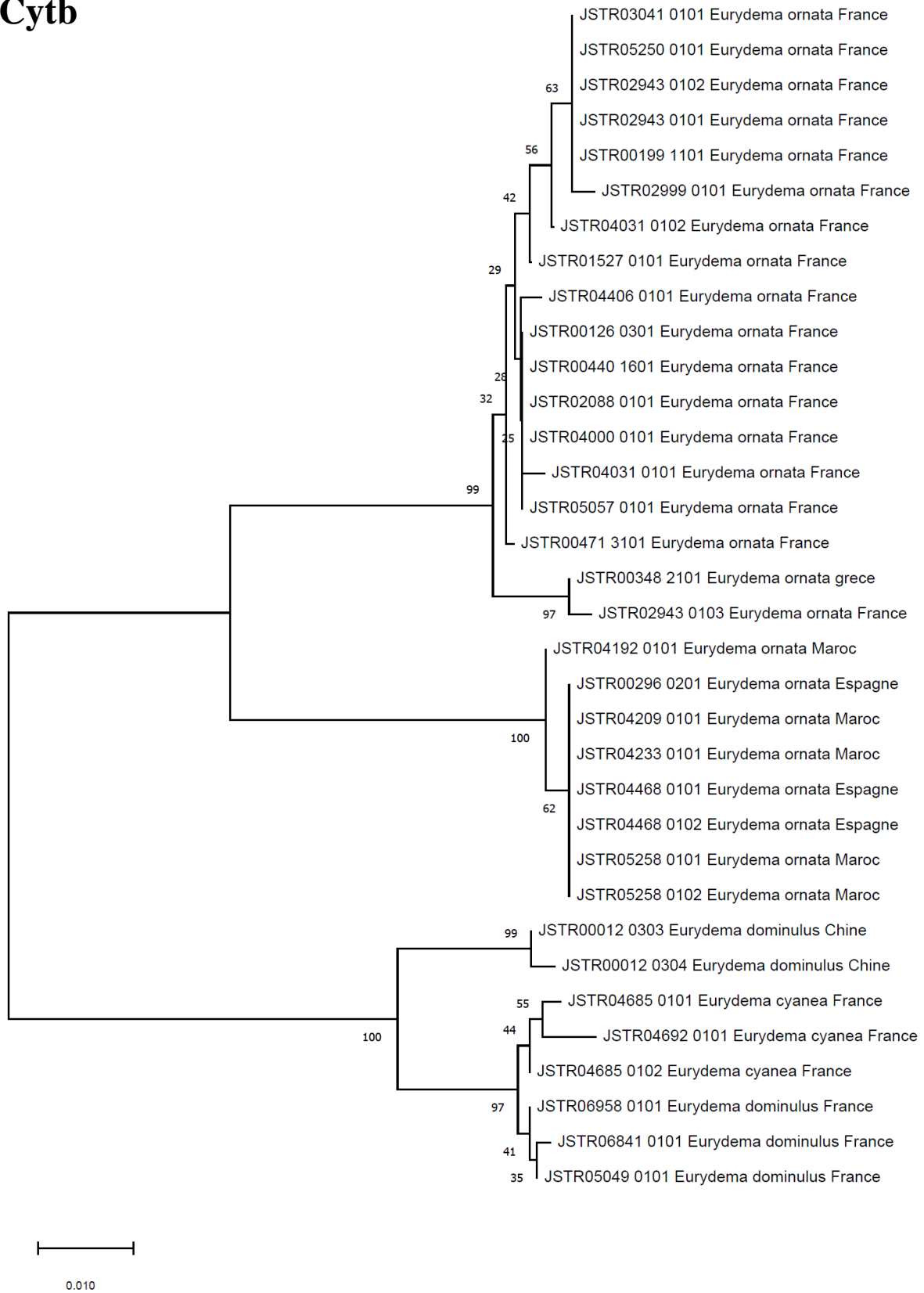


Figure 2 : Arbre phylogénétique reconstruit à partir des séquences Cytb en NJ (K2P) avec 1000 répliquats de bootstrap

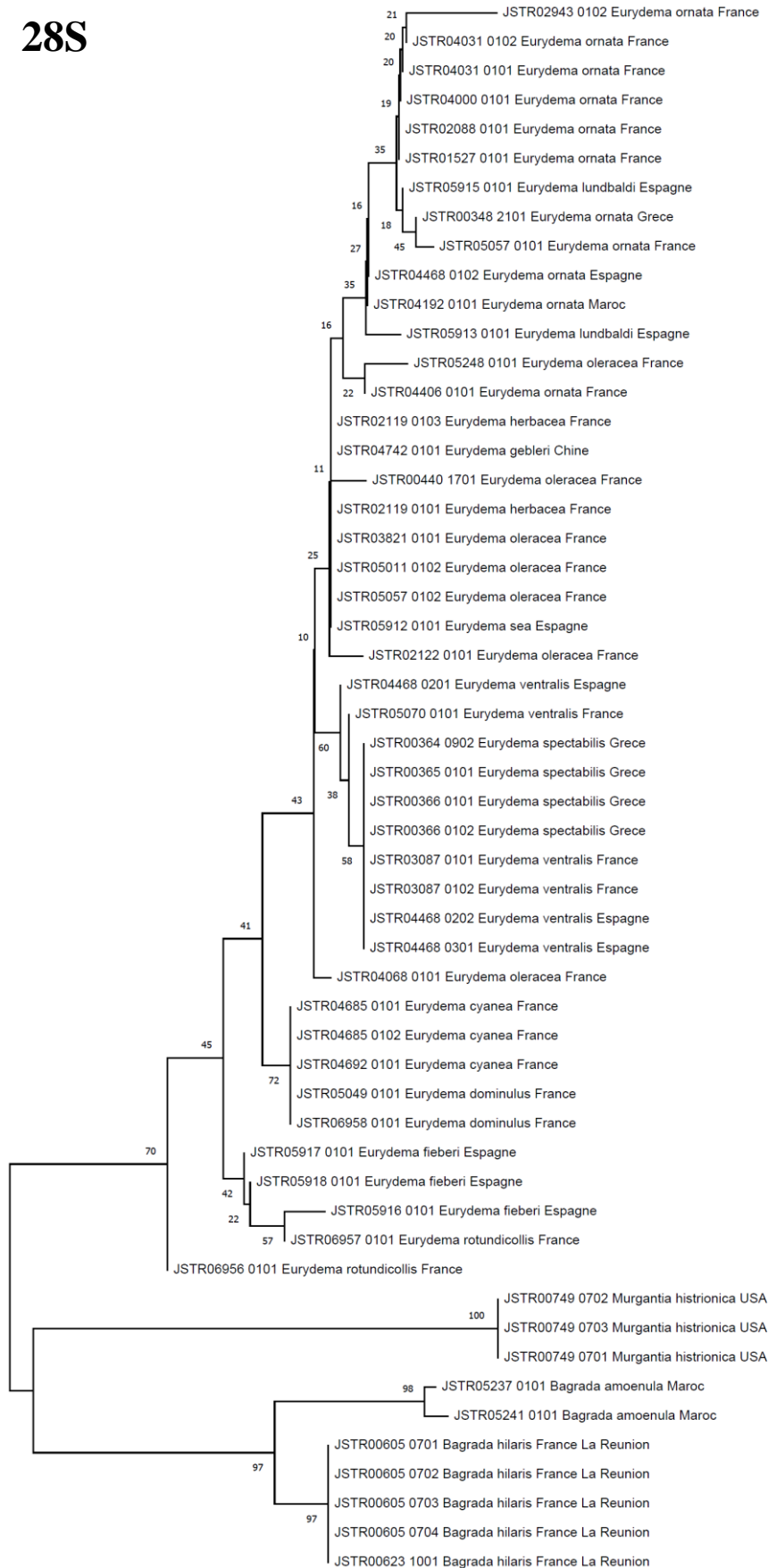


Figure 3 : Arbre phylogénétique reconstruit à partir des séquences 28S en NJ (K2P) avec 1000 répliqués de bootstrap

ITS

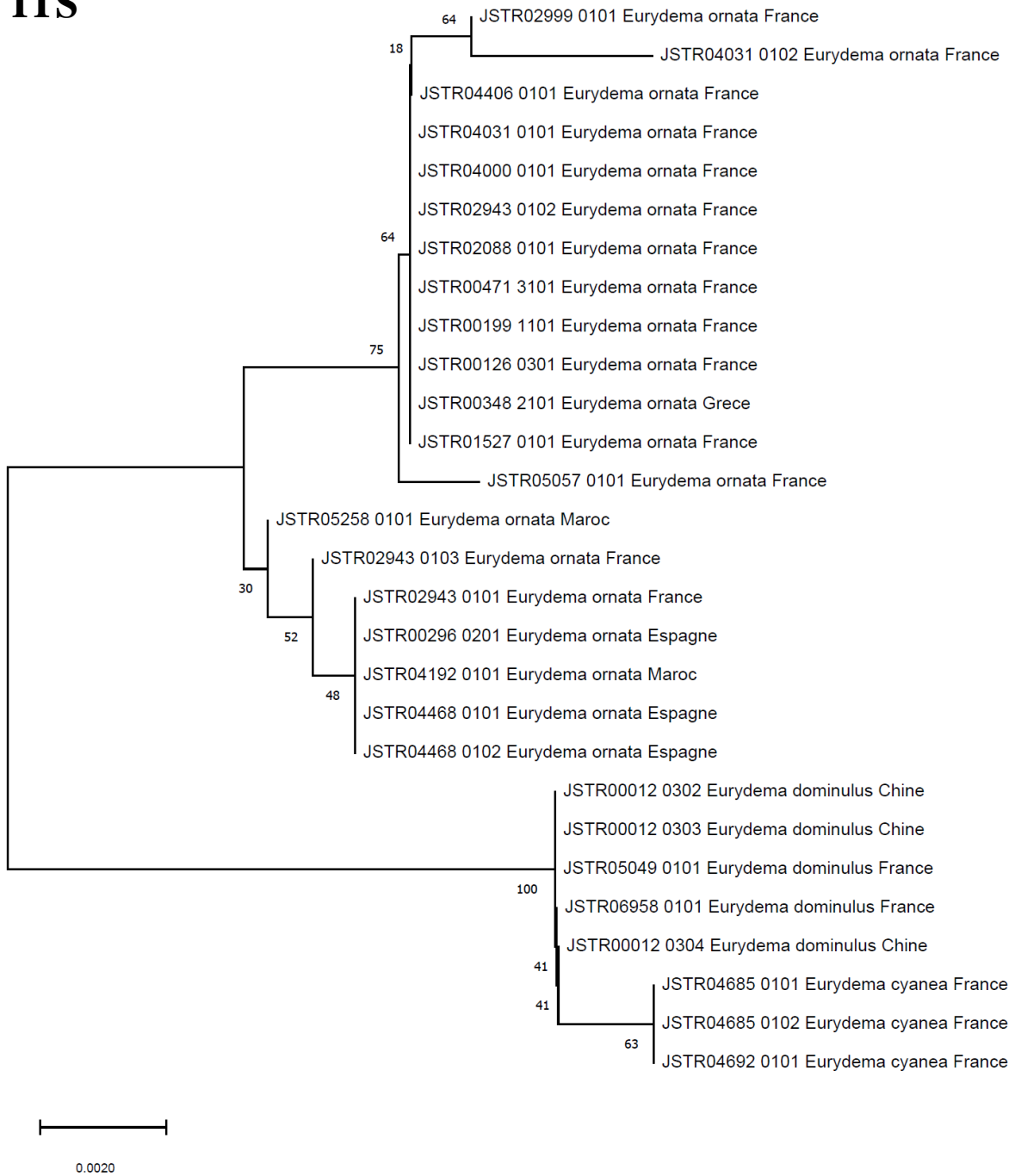


Figure 4 : Arbre phylogénétique reconstruit à partir des séquences ITS en NJ (K2P) avec 1000 réplicats de bootstrap

Annexe 7 : *Lygus* Reconnaissance à l'aveugle

Tableau 1 : Résultat des identifications à l'aveugle effectuées par A. Matocq, J.C. Streito, E. Pierre et J. Fandos. Les cases noires sont des données manquantes.

ID	Nom identification	A. Matocq		J.C. Streito		E. Pierre		J. Fandos		Place dans phylogénie COI
		Morphologie générale	spéciale	Morphologie générale	spéciale	Morphologie générale et spéciale	spéciale	Morphologie générale et spéciale	spéciale	
JSTR0462_0105	wagneri	punctatus	punctatus	rugulipennis	pratenis	punctatus	wagneri	wagneri	wagneri	pratenis/wagneri
JSTR0469_0304	pratenis	pratenis?	punctatus	pratenis	pratenis	pratenis	pratenis	pratenis	pratenis	pratenis/wagneri
JSTR0275_0804	punctatus	rugulipennis? punctatus?		punctatus	rugulipennis	wagneri	pratenis	wagneri	wagneri	pratenis/punctatus/wagneri
JSTR0689_0504	gemellatus	gemellatus		gemellatus	gemellatus	wagneri	pratenis	wagneri	wagneri	pratenis/punctatus/wagneri
JSTR0215_0104	maritimus	gemellatus	?	maritimus	gemellatus	maritimus	pratenis? halicus?	maritimus	maritimus	gemellatus/halicus/maritimus
JSTR0553_0104	wagneri	punctatus	pratenis? Punctatus?	pratenis	pratenis	pratenis	wagneri	wagneri	wagneri	pratenis/punctatus/wagneri
JSTR0689_0104	pratenis	pratenis		pratenis	pratenis	pratenis	pratenis	pratenis	pratenis	pratenis/punctatus/wagneri
JSTR0379_0104	punctatus	rugulipennis	wagneri	rugulipennis	rugulipennis	wagneri	rugulipennis? Wagneri?	rugulipennis? Wagneri?	rugulipennis? Wagneri?	indéterminé
JSTR0270_1402	gemellatus	gemellatus		gemellatus	gemellatus	maritimus	maritimus? halicus?	maritimus	maritimus	gemellatus/halicus/maritimus
JSTR0209_0102	maritimus	maritimus		gemellatus	gemellatus	maritimus	halicus	maritimus	maritimus	gemellatus/halicus/maritimus
JSTR0540_0104	halicus	maritimus		maritimus	maritimus	maritimus	halicus	maritimus	maritimus	gemellatus/halicus/maritimus
JSTR0372_0104	gemellatus	italicus	maritimus	italicus	gemellatus	italicus	italicus	italicus	italicus	gemellatus/halicus/maritimus
JSTR05209_0104	gemellatus	gemellatus		gemellatus	gemellatus	maritimus	italicus	italicus	italicus	gemellatus/halicus/maritimus
JSTR0391_0204	punctatus	punctatus	pratenis? Punctatus?	punctatus	punctatus	punctatus	pratenis? halicus?	pratenis? halicus?	pratenis? halicus?	gemellatus/halicus/maritimus
JSTR0588_0104	punctatus	?	?	pratenis?	pratenis?	pratenis?	wagneri???	wagneri???	maritimus	punctatus/mecanour
JSTR0199_0104	pratenis	pratenis		pratenis?	pratenis?	pratenis?	pratenis	pratenis	pratenis	pratenis
JSTR0484_0104	rugulipennis	rugulipennis		pratenis? wagneri?	pratenis?	pratenis?	pratenis	pratenis	pratenis	pratenis
JSTR0191_0104	pratenis	rugulipennis		rugulipennis	rugulipennis	pratenis	pratenis	pratenis	pratenis	pratenis
JSTR03405_0104	gemellatus	punctatus? Rugulipennis?	wagneri	rugulipennis	rugulipennis	rugulipennis	rugulipennis	rugulipennis	wagneri	rugulipennis
JSTR0269_0804	punctatus	punctatus	punctatus	pratenis	pratenis	punctatus	punctatus	pratenis? Wagneri?	gemellatus	gemellatus
JSTR0462_0104	wagneri	rugulipennis	wagneri	rugulipennis	rugulipennis	pratenis	pratenis	pratenis? rugulipennis?	pratenis	pratenis
JSTR0335_0104	punctatus	punctatus		punctatus	punctatus	wagneri	wagneri	gemellatus	gemellatus? Pratenis?	pratenis
JSTR0207_0104	rugulipennis	pratenis	maritimus? Wagneri?	rugulipennis	rugulipennis	rugulipennis	rugulipennis	rugulipennis	rugulipennis	pratenis

Tableau 3: Liste des adaptateurs utilisés pour la technique RADseq

ID	Adaptateur P1	Adaptateur P2	Species
JSTR00119_0603	AAGGG	ACCTAT	<i>Lygus rugulipennis</i>
JSTR04972_0101	ACAAT	ACCTAT	<i>Lygus pratensis</i>
JSTR00283_0601	CGGAC	ACCTAT	<i>Lygus maritimus</i>
JSTR03365_0101	CTAGA	ACCTAT	<i>Lygus punctatus</i>
JSTR00736_0401	GATAA	ACCTAT	<i>Lygus vanduzeei</i>
JSTR05259_0101	GCCGC	ACCTAT	<i>Lygus gemellatus</i>
JSTR05533_0102	TGTGT	ACCTAT	<i>Lygus wagneri</i>
EPIE00836_0103	TTCAG	ACCTAT	<i>Lygus italicus</i>
JSTR05196_0101	AAGGG	TAGGTCT	<i>Lygus rugulipennis</i>
JSTR05260_0101	ACAAT	TAGGTCT	<i>Lygus pratensis</i>
JSTR02049_0102	CGGAC	TAGGTCT	<i>Lygus maritimus</i>
JSTR00269_0801	CTAGA	TAGGTCT	<i>Lygus punctatus</i>
JSTR01749_0101	GATAA	TAGGTCT	<i>Lygus bradleyi</i>
JSTR07979_0101	GCCGC	TAGGTCT	<i>Lygus gemellatus</i>
JSTR05533_0101	TGTGT	TAGGTCT	<i>Lygus wagneri</i>
JSTR05140_0101	TTCAG	TAGGTCT	<i>Lygus italicus</i>
JSTR05315_0101	AAGGG	CGTACT	<i>Lygus rugulipennis</i>
JSTR04408_0101	ACAAT	CGTACT	<i>Lygus pratensis</i>
JSTR02131_0101	CGGAC	CGTACT	<i>Lygus maritimus</i>
JSTR00176_0601	CTAGA	CGTACT	<i>Lygus punctatus</i>
JRAS03323_0301	GATAA	CGTACT	<i>Lygus lineolaris</i>
JSTR03732_0101	GCCGC	CGTACT	<i>Lygus gemellatus</i>
JSTR04652_0101	TGTGT	CGTACT	<i>Lygus wagneri</i>
EPIE00836_0102	TTCAG	CGTACT	<i>Lygus italicus</i>
JSTR05582_0101	AAGGG	GTACGAT	<i>Lygus rugulipennis</i>
JSTR05201_0101	ACAAT	GTACGAT	<i>Lygus pratensis</i>
GGEN00001_0101	CGGAC	GTACGAT	<i>Lygus maritimus</i>
JSTR03405_0201	CTAGA	GTACGAT	<i>Lygus punctatus</i>
JSTR00272_0801	GATAA	GTACGAT	<i>Apolygus lucorum</i>
JSTR00329_0801	GCCGC	GTACGAT	<i>Lygus gemellatus</i>
JSTR04652_0105	TGTGT	GTACGAT	<i>Lygus wagneri</i>
JSTR05140_0102	TTCAG	GTACGAT	<i>Lygus italicus</i>

Annexe 9 : *Lygus* Arbres phylogénétiques en ML

Cytb

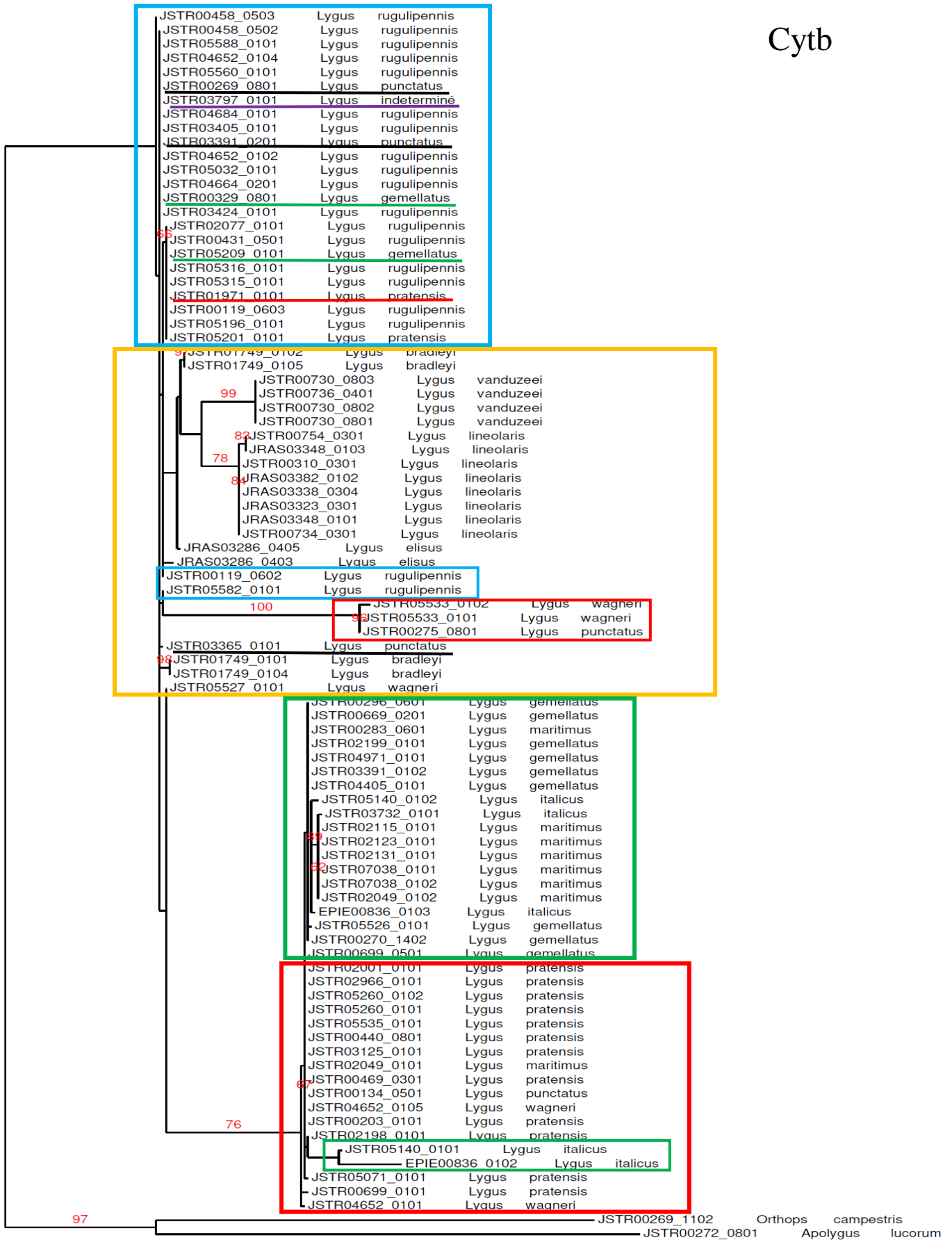


Figure 1 : Arbre phylogénétique reconstruit à partir des séquences de Cytb en ML avec 1000 répliquions de bootstrap.

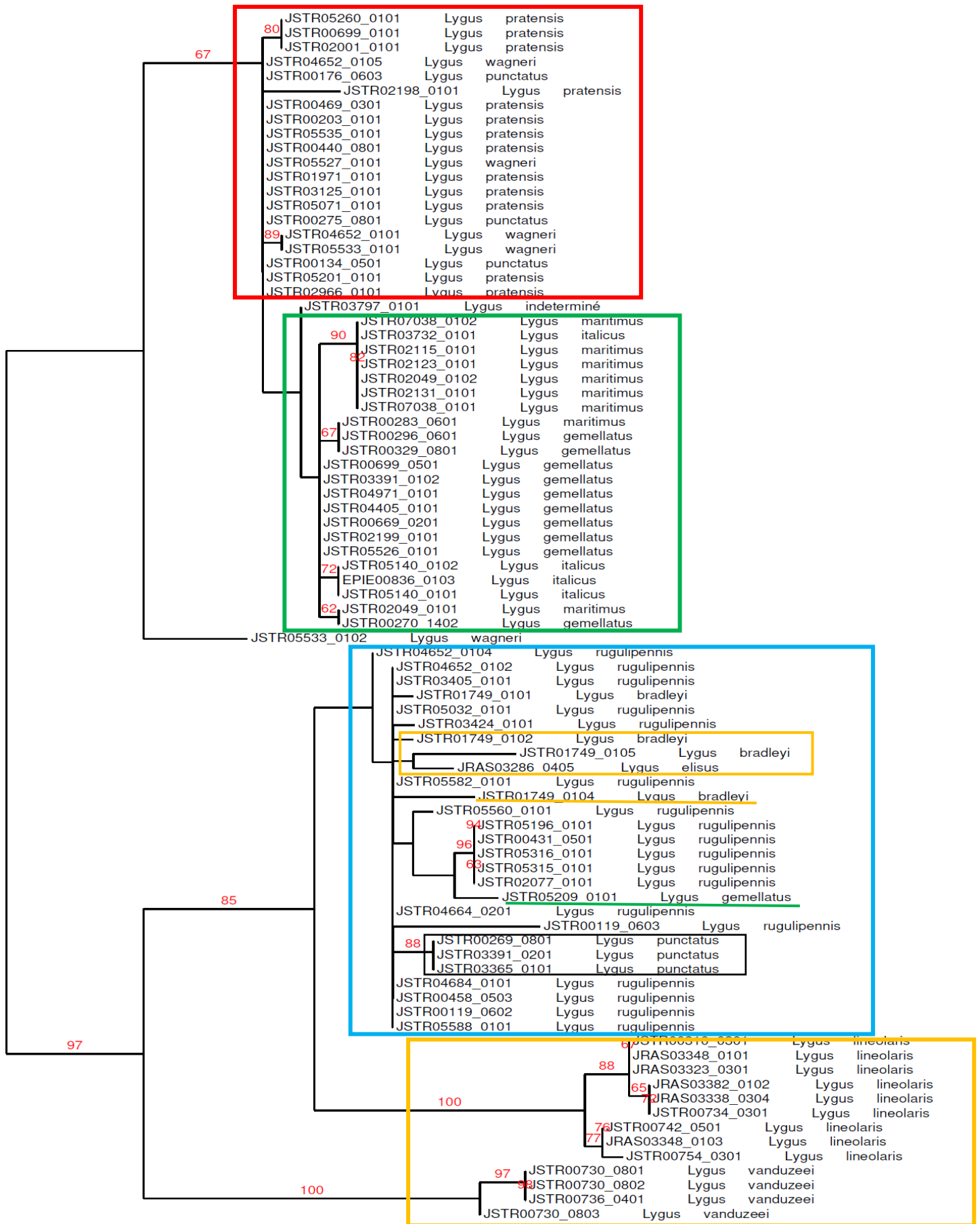


Figure 2 : Arbre phylogénétique reconstruit à partir des séquences de ND5 en ML avec 1000 répliquions de bootstrap.

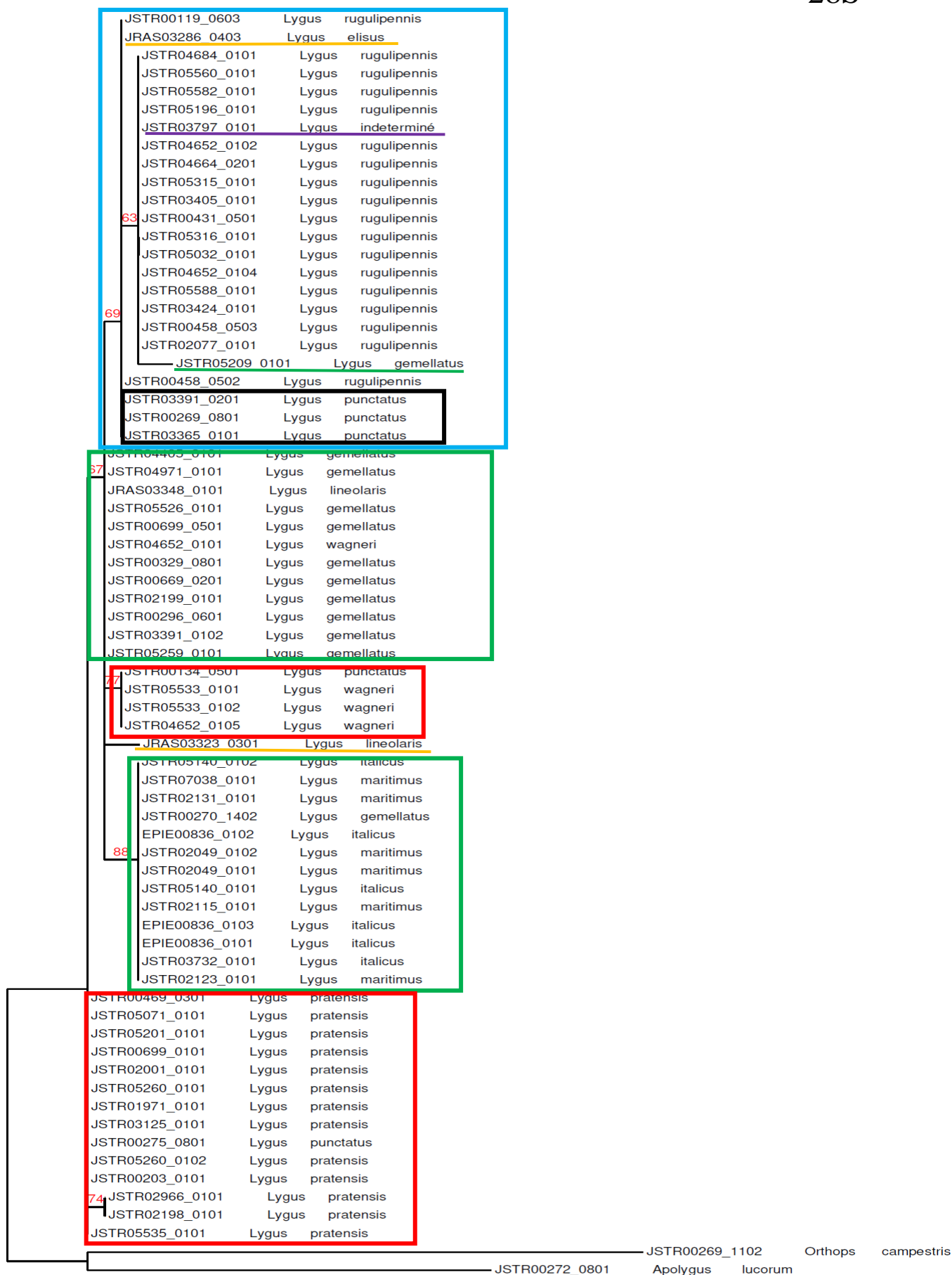


Figure 3 : Arbre phylogénétique reconstruit à partir des séquences de 28S en ML avec 1000 répliquions de bootstrap.

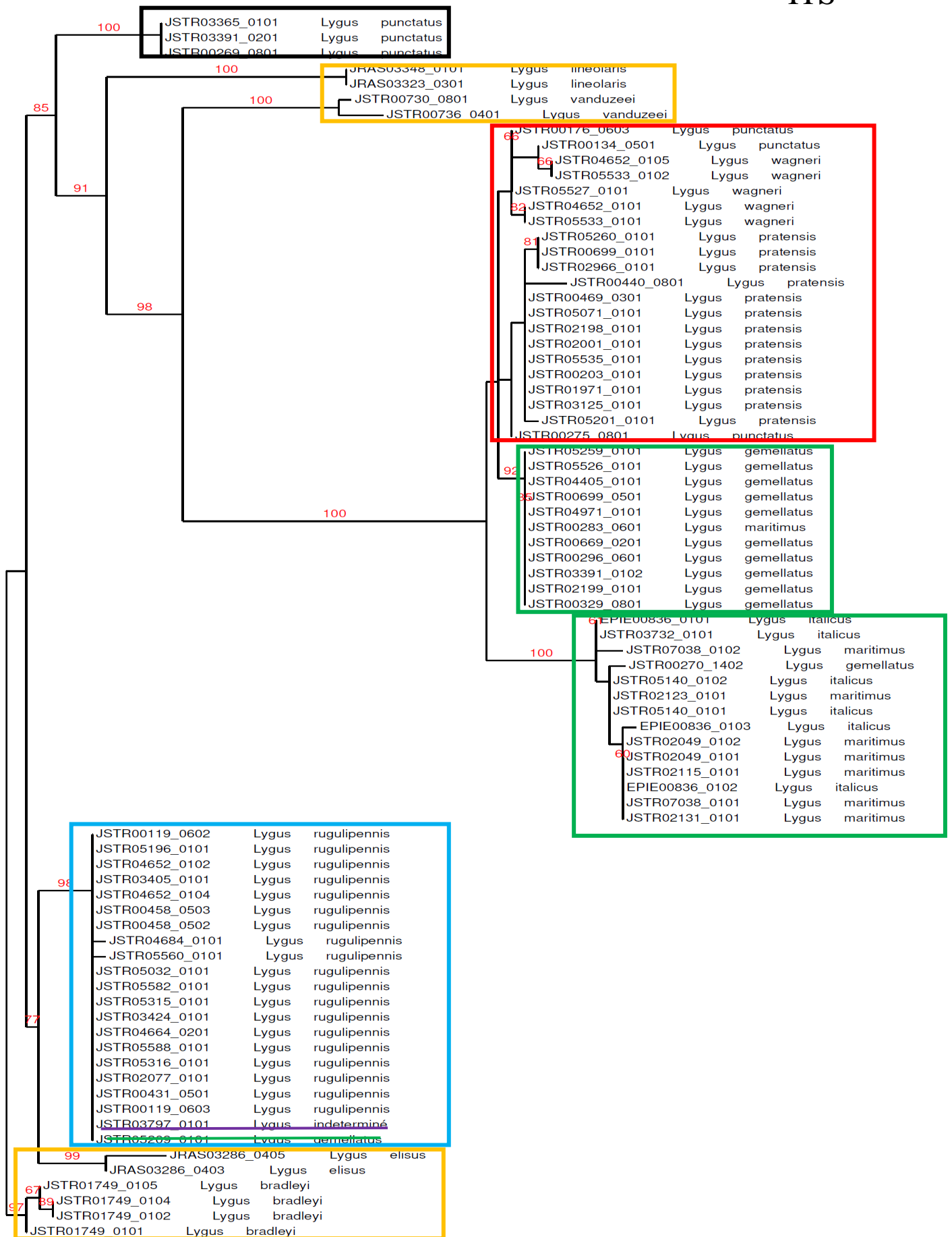


Figure 4 : arbre phylogénétique reconstruit à partir des séquences de ITS en ML avec 1000 répliquions de bootstrap.

Annexe 10 : *Lygus* Arbres phylogénétiques en NJ



Figure 1 : Arbre phylogénétique reconstruit à partir des séquences COI en Neighbour-Joining avec le modèle K2P et 1000 répliquations de bootstrap.

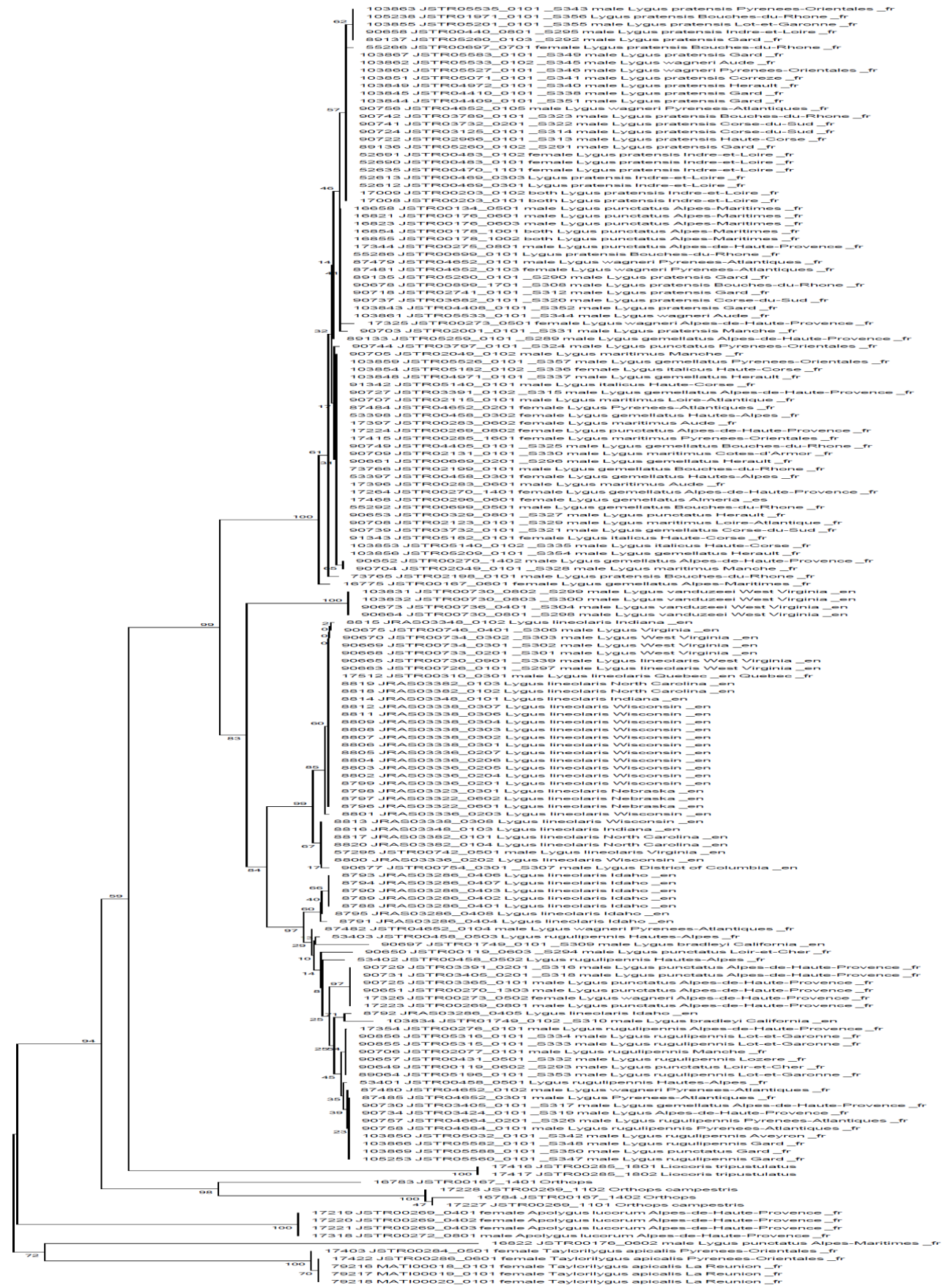


Figure 3 : arbre phylogénétique reconstruit à partir de toutes les séquences COI (individus mâles et femelles) en Neighbour Joining avec le modèle K2P et 1000 répliquations de bootstrap.

Cytb



Figure 3 : Arbre phylogénétique reconstruit à partir des séquences Cytb en Neighbour Joining avec le modèle K2P et 1000 répliquations de bootstrap.

ND5

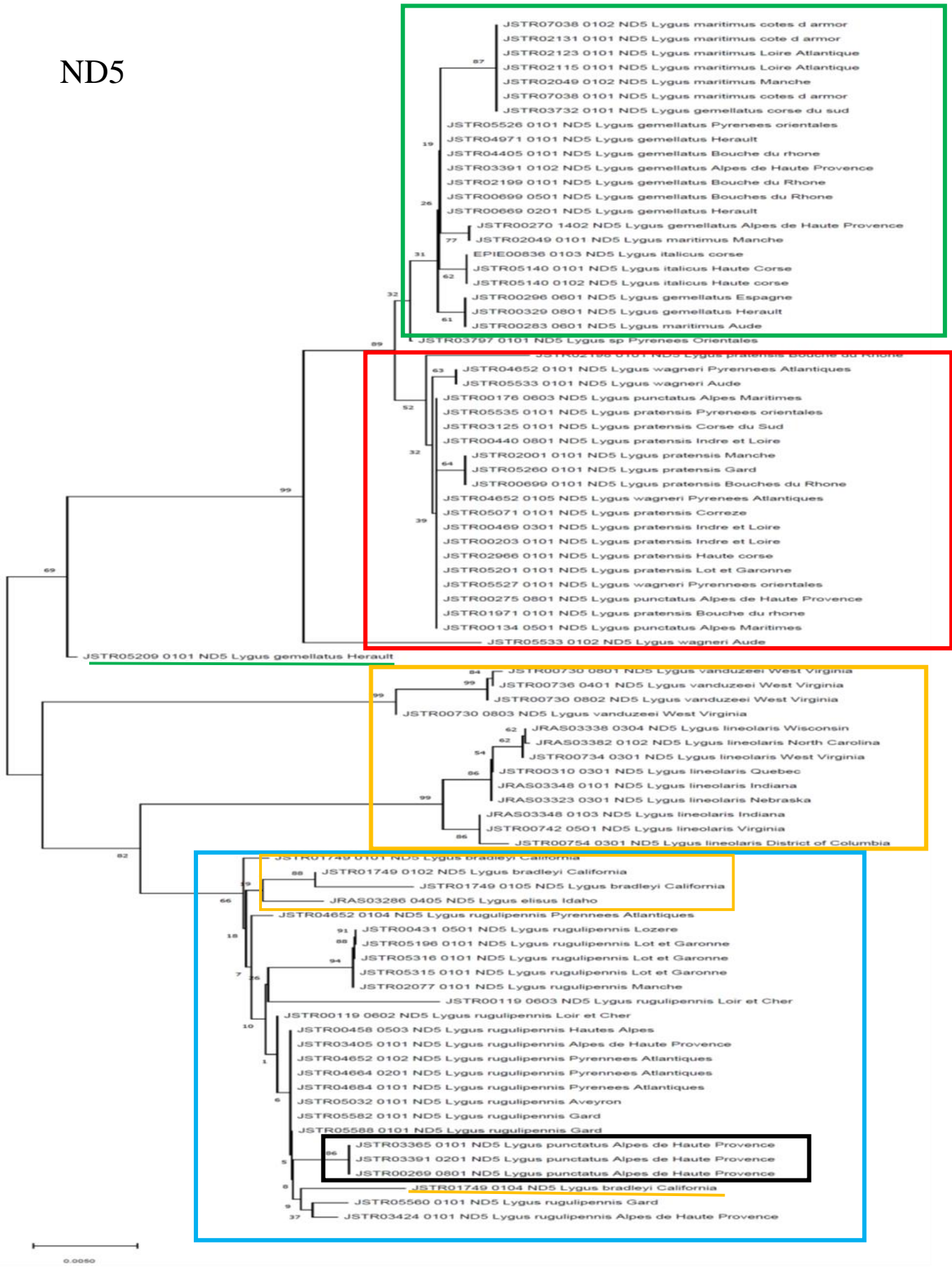


Figure 5 : Arbre phylogénétique reconstruit à partir des séquences ND5 en Neighbour Joining avec le modèle K2P et 1000 répliquions de bootstrap.

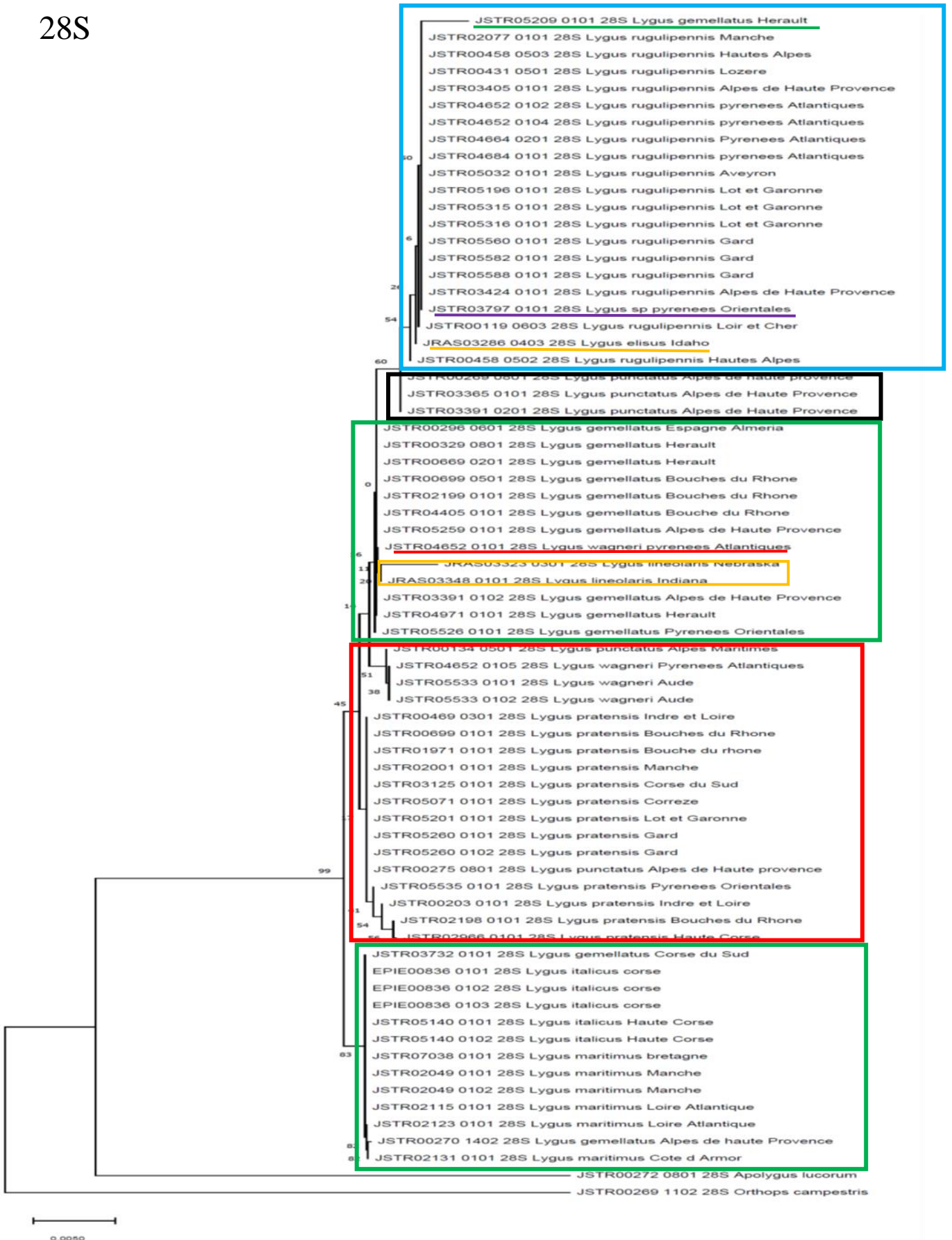


Figure 5 : Arbre phylogénétique reconstruit à partir des séquences 28S en Neighbour Joining avec le modèle K2P et 1000 réplifications de bootstrap.

ITS



Figure 64 : Arbre phylogénétique reconstruit à partir des séquences ITS en Neighbour Joining avec le modèle K2P et 100 répliquions de bootstrap.

Annexe 11 : Matrices de distances

Cytb

Tableau 1 : matrice de distances interspécifiques calculée avec le modèle d'évolution K2P.

Lygus_gemellatus		0,006	0,004	0,004	0,008	0,010	0,012	0,012	0,013	0,013	0,012	0,012	0,022	0,022
Lygus_italicus	0,034		0,006	0,006	0,009	0,011	0,014	0,014	0,015	0,015	0,015	0,014	0,023	0,022
Lygus_maritimus	0,020	0,027		0,004	0,009	0,011	0,015	0,015	0,015	0,015	0,015	0,015	0,023	0,022
Lygus_pratensis	0,025	0,034	0,020		0,008	0,010	0,012	0,012	0,013	0,013	0,012	0,012	0,022	0,022
Lygus_wagneri	0,062	0,066	0,064	0,061		0,009	0,010	0,010	0,011	0,012	0,011	0,011	0,021	0,022
Lygus_punctatus	0,065	0,076	0,074	0,066	0,067		0,005	0,005	0,009	0,009	0,006	0,006	0,021	0,021
Lygus_rugulipennis	0,071	0,089	0,088	0,072	0,073	0,037		0,001	0,010	0,009	0,004	0,004	0,022	0,022
Lygus_sp	0,069	0,087	0,086	0,071	0,071	0,035	0,002		0,010	0,009	0,004	0,004	0,022	0,022
Lygus_vaduzeei	0,081	0,092	0,092	0,082	0,084	0,064	0,045	0,043		0,011	0,010	0,010	0,022	0,022
Lygus_lineolaris	0,080	0,092	0,091	0,080	0,083	0,062	0,041	0,041	0,051		0,009	0,009	0,021	0,022
Lygus_elisus	0,076	0,095	0,092	0,076	0,077	0,044	0,012	0,012	0,046	0,042		0,004	0,022	0,022
Lygus_bradleyi	0,076	0,092	0,090	0,077	0,079	0,045	0,013	0,012	0,048	0,043	0,015		0,022	0,022
Apolygus_outgroup_1	0,177	0,175	0,176	0,178	0,179	0,176	0,176	0,175	0,169	0,163	0,180	0,175		0,022
Orthops_outgroup_2	0,179	0,180	0,179	0,181	0,190	0,179	0,172	0,169	0,160	0,176	0,174	0,172	0,172	

Tableau 2 : matrice de distances intra-spécifiques

	distance	écart type
Lygus gemellatus	0,028	0,004
Lygus italicus	0,034	0,008
Lygus maritimus	0,004	0,002
Lygus pratensis	0,024	0,004
Lygus wagneri	0,076	0,010
Lygus punctatus	0,064	0,009
Lygus rugulipennis	0,003	0,002
Lygus sp	n/c	n/c
Lygus vaduzeei	0,000	0,000
Lygus lineolaris	0,002	0,001
Lygus elisus	0,019	0,006
Lygus bradleyi	0,016	0,005
Apolygus outgroup 1	n/c	n/c
Orthops outgroup 2	n/c	n/c

ND5

Tableau 3 : matrice de distances interspécifiques calculée avec le modèle d'évolution K2P.

Lygus_gemellatus		0,001	0,002	0,002	0,002	0,004	0,006	0,001	0,007	0,007	0,006	0,006
Lygus_italicus	0,003		0,002	0,003	0,003	0,004	0,006	0,002	0,007	0,007	0,007	0,006
Lygus_maritimus	0,004	0,004		0,003	0,003	0,004	0,007	0,002	0,007	0,008	0,007	0,007
Lygus_pratensis	0,007	0,006	0,007		0,001	0,004	0,007	0,002	0,007	0,008	0,007	0,007
Lygus_wagneri	0,008	0,008	0,009	0,004		0,004	0,006	0,002	0,007	0,007	0,007	0,006
Lygus_punctatus	0,021	0,021	0,023	0,020	0,021		0,004	0,004	0,006	0,006	0,004	0,004
Lygus_rugulipennis	0,033	0,035	0,038	0,038	0,036	0,021		0,006	0,006	0,005	0,002	0,002
Lygus_sp	0,003	0,003	0,004	0,003	0,006	0,019	0,035		0,007	0,007	0,007	0,006
Lygus_vaduzeei	0,041	0,041	0,044	0,044	0,042	0,039	0,033	0,041		0,007	0,007	0,006
Lygus_lineolaris	0,043	0,043	0,046	0,046	0,046	0,036	0,025	0,043	0,041		0,006	0,006
Lygus_elisus	0,034	0,035	0,038	0,038	0,036	0,022	0,006	0,035	0,036	0,025		0,002
Lygus_bradleyi	0,035	0,035	0,039	0,039	0,037	0,023	0,006	0,035	0,034	0,026	0,006	

Tableau 4 : matrice de distances intra-spécifiques

	distance	ecart-type
Lygus gemellatus	0,0040	0,001
Lygus italicus	0,0000	0,000
Lygus maritimus	0,0018	0,001
Lygus pratensis	0,0013	0,001
Lygus wagneri	0,0063	0,002
Lygus punctatus	0,0236	0,004
Lygus rugulipennis	0,0037	0,001
Lygus sp	n/c	n/c
Lygus vanduzeei	0,0014	0,001
Lygus lineolaris	0,0030	0,001
Lygus elisus	n/c	n/c
Lygus bradleyi	0,0070	0,002

28S

Tableau 5 : matrice de distances interspécifiques calculée avec le modèle d'évolution K2P.

Lygus_gemellatus		0,002	0,002	0,002	0,001	0,001	0,002	0,002	0,002	0,002	0,010	0,008
Lygus_italicus	0,003		0,000	0,003	0,002	0,002	0,003	0,003	0,003	0,003	0,010	0,008
Lygus_maritimus	0,003	0,000		0,003	0,002	0,002	0,003	0,003	0,003	0,003	0,010	0,008
Lygus_pratensis	0,003	0,005	0,005		0,002	0,001	0,002	0,002	0,003	0,004	0,010	0,008
Lygus_wagneri	0,002	0,004	0,004	0,003		0,001	0,002	0,002	0,002	0,003	0,010	0,008
Lygus_punctatus	0,002	0,004	0,004	0,002	0,002		0,001	0,002	0,002	0,001	0,010	0,008
Lygus_rugulipennis	0,003	0,006	0,006	0,004	0,004	0,002		0,000	0,003	0,000	0,010	0,008
Lygus_sp	0,003	0,006	0,006	0,005	0,004	0,003	0,000		0,003	0,000	0,010	0,008
Lygus_lineolaris	0,003	0,005	0,005	0,004	0,003	0,004	0,005	0,005		0,003	0,012	0,011
Lygus_elisus	0,003	0,005	0,005	0,005	0,005	0,002	0,000	0,000	0,004		0,015	0,013
Orthops_outgroup1	0,057	0,056	0,056	0,056	0,058	0,057	0,060	0,060	0,067	0,081		0,011
Apolygus_outgroup2	0,046	0,046	0,046	0,045	0,047	0,046	0,049	0,049	0,056	0,061	0,069	

Tableau 6 : matrice de distances intra-spécifiques

	distance	ecart type
Lygus gemellatus	0,0017	0,001
Lygus italicus	0,0000	0,000
Lygus maritimus	0,0000	0,000
Lygus pratensis	0,0004	0,000
Lygus wagneri	0,0007	0,001
Lygus punctatus	0,0018	0,001
Lygus rugulipennis	0,0000	0,000
Lygus sp	n/c	n/c
Lygus lineolaris	0,0032	0,003
Lygus elisus	n/c	n/c
Orthops outgroup1	n/c	n/c
Apolygus outgroup2	n/c	n/c

ITS

Tableau 7 : matrice de distances interspécifiques calculée avec le modèle d'évolution K2P.

Lygus_gemellatus		0,003	0,003	0,002	0,002	0,003	0,005	0,005	0,006	0,006	0,006	0,006
Lygus_italicus	0,012		0,001	0,004	0,004	0,004	0,006	0,006	0,006	0,007	0,007	0,007
Lygus_maritimus	0,012	0,003		0,003	0,003	0,004	0,006	0,006	0,006	0,007	0,007	0,007
Lygus_pratensis	0,008	0,012	0,012		0,002	0,003	0,006	0,006	0,006	0,006	0,006	0,006
Lygus_wagneri	0,008	0,013	0,012	0,005		0,003	0,006	0,006	0,006	0,007	0,006	0,006
Lygus_punctatus	0,021	0,026	0,026	0,019	0,019		0,004	0,004	0,005	0,005	0,005	0,004
Lygus_rugulipennis	0,032	0,040	0,040	0,034	0,036	0,024		0,000	0,005	0,005	0,004	0,003
Lygus_sp	0,032	0,041	0,041	0,034	0,037	0,024	0,000		0,005	0,005	0,004	0,003
Lygus_vanduzeei	0,034	0,039	0,039	0,033	0,036	0,031	0,026	0,026		0,005	0,006	0,005
Lygus_lineolaris	0,040	0,045	0,044	0,040	0,044	0,032	0,023	0,023	0,031		0,006	0,005
Lygus_elisus	0,033	0,040	0,040	0,033	0,035	0,027	0,013	0,013	0,028	0,026		0,005
Lygus_bradleyi	0,033	0,040	0,040	0,034	0,037	0,023	0,009	0,009	0,026	0,024	0,018	

Tableau 8 : matrice de distances intra-spécifiques

	distance	écart-type
Lygus gemellatus	0,0084	0,0014
Lygus italicus	0,0012	0,0008
Lygus maritimus	0,0041	0,0011
Lygus pratensis	0,0010	0,0005
Lygus wagneri	0,0022	0,0012
Lygus punctatus	0,0206	0,0032
Lygus rugulipennis	0,0002	0,0001
Lygus sp	n/c	n/c
Lygus vanduzeei	0,0039	0,0019
Lygus lineolaris	0,0000	0,0000
Lygus elisus	0,0042	0,0029
Lygus bradleyi	0,0011	0,0008

Annexe 12 : Réseaux d'haplo-types

Cytb

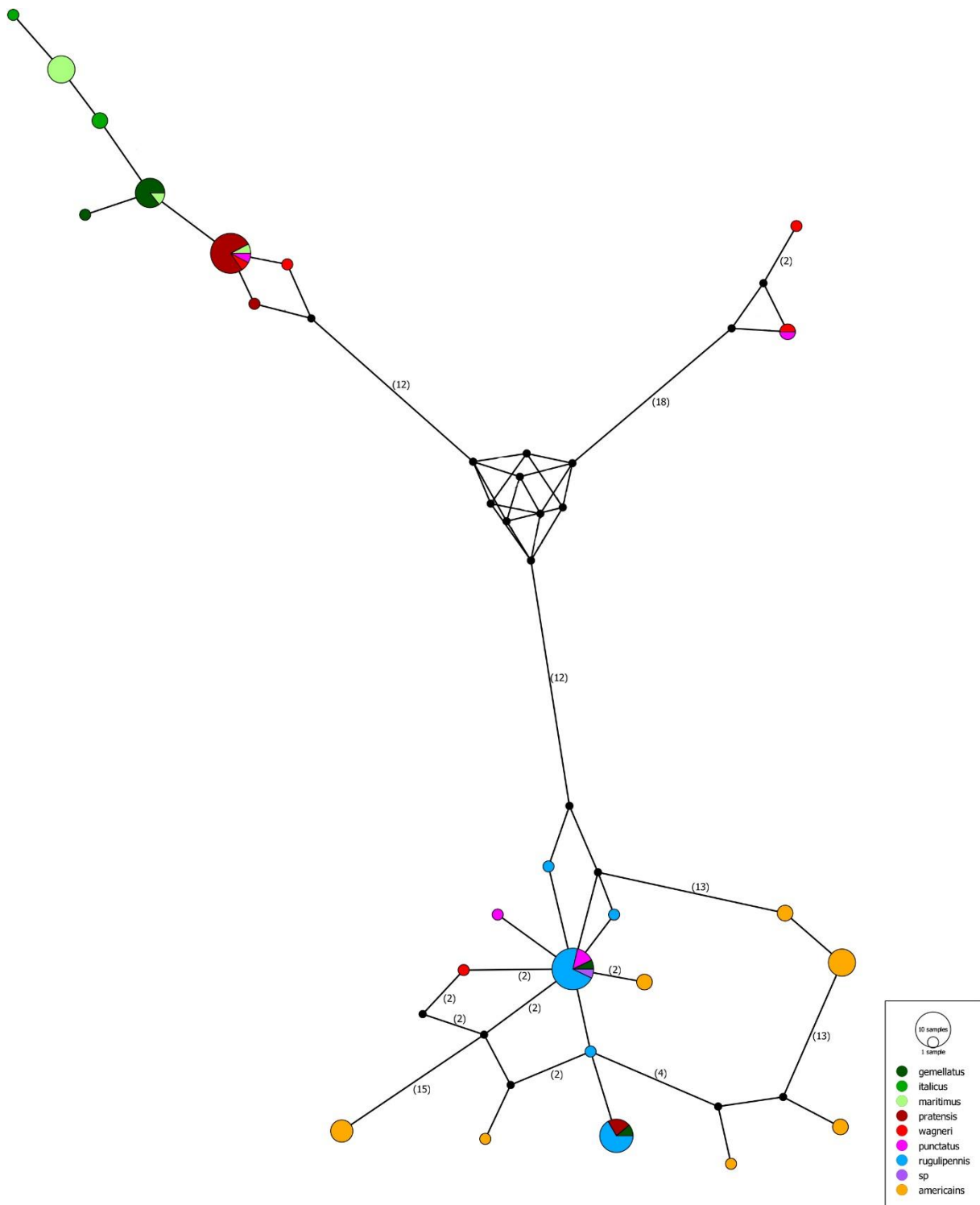


Figure1 ::Réseaux d'haplotypes effectués sur 81 échantillons de Lygus

ND5

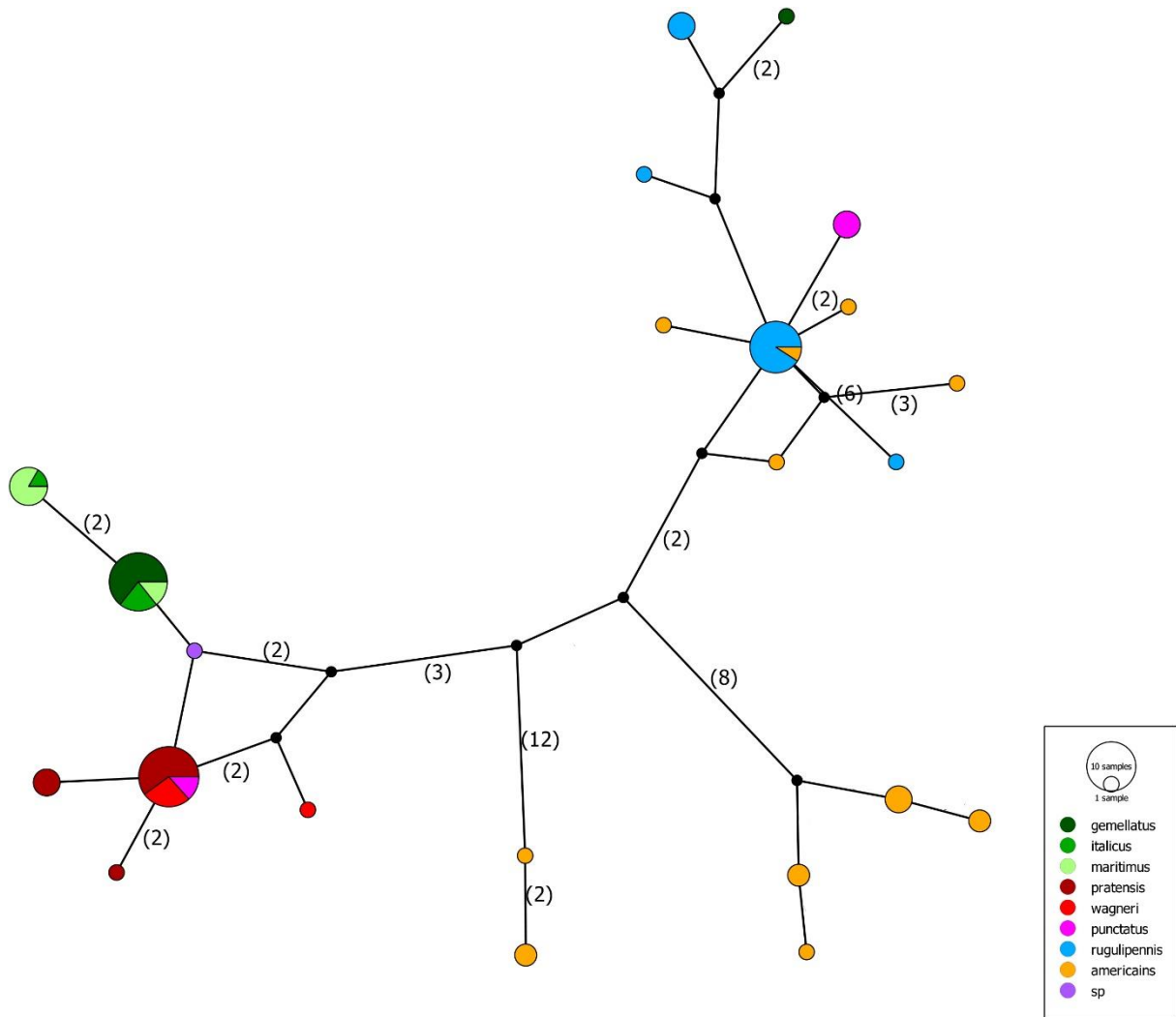


Figure 2 : Réseaux d'haplotypes effectués sur 76 échantillons de Lygus

28S

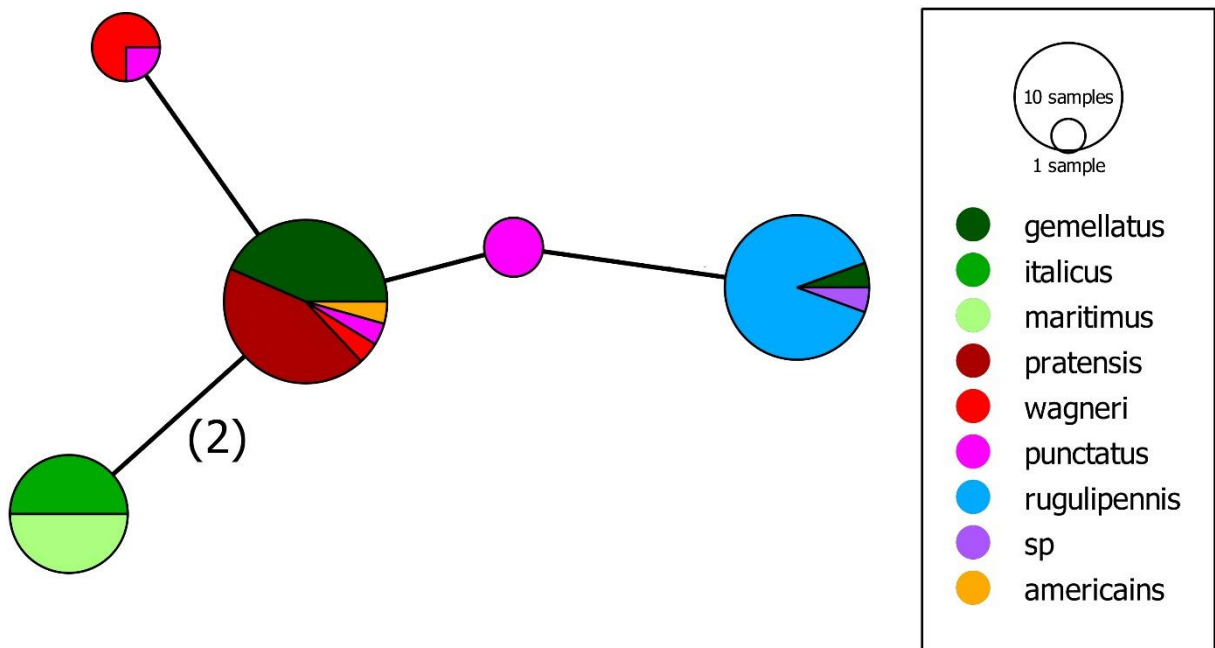


Figure 3 : Réseaux d'haplotypes effectués sur 60 échantillons de Lygus

ITS

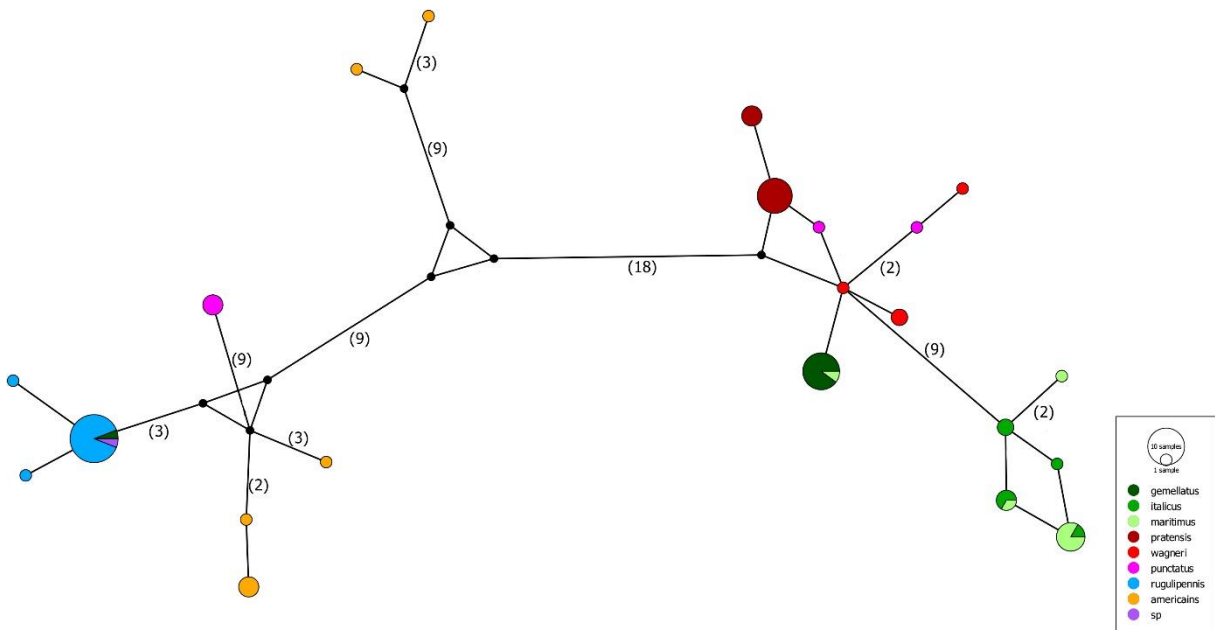


Figure 4 : Réseaux d'haplotypes effectués sur 70 échantillons de Lygus

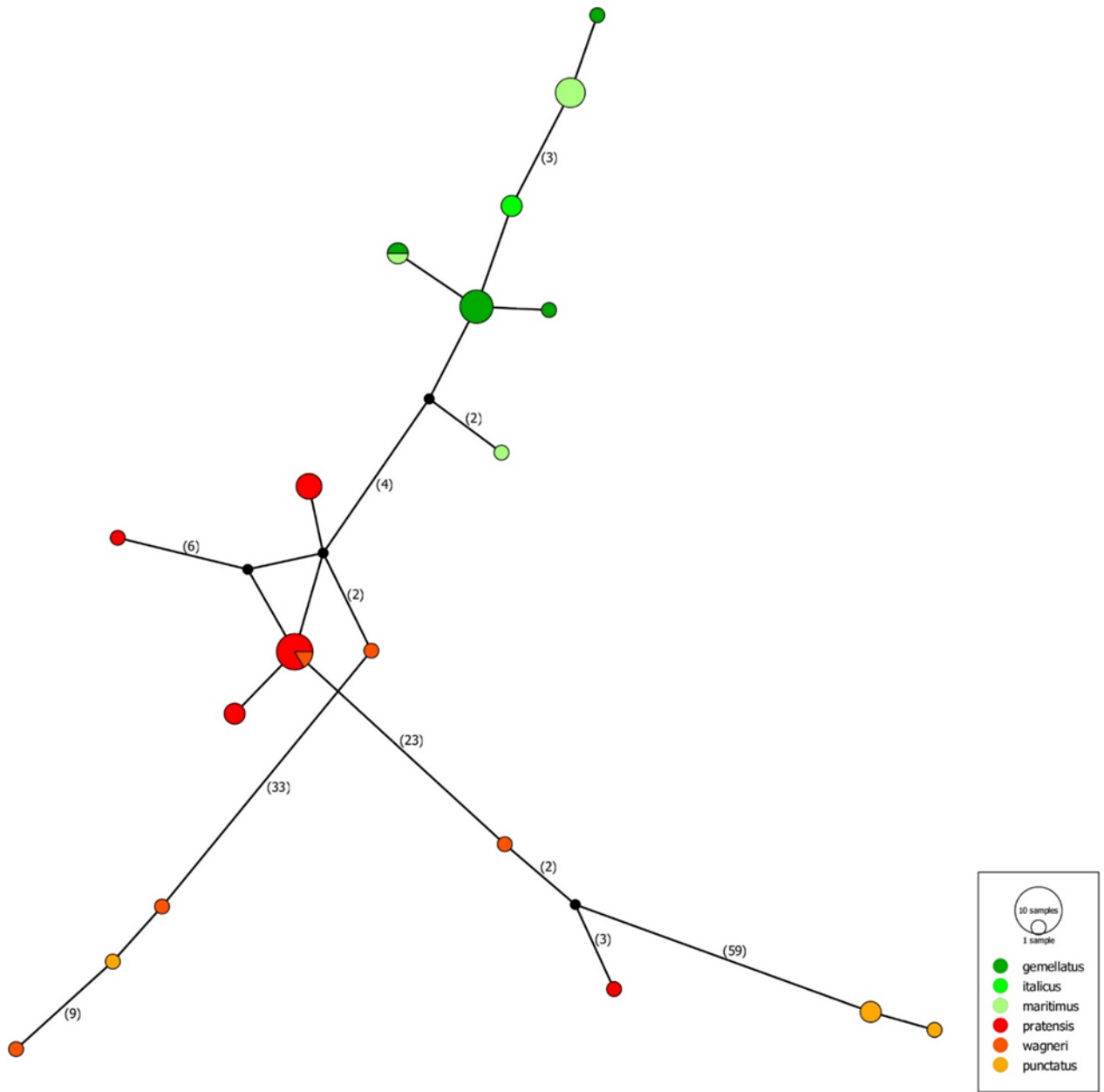


Figure 5 : Réseau d'haplo-types issus de la concaténation des séquences mitochondriales des *Lygus* européens.

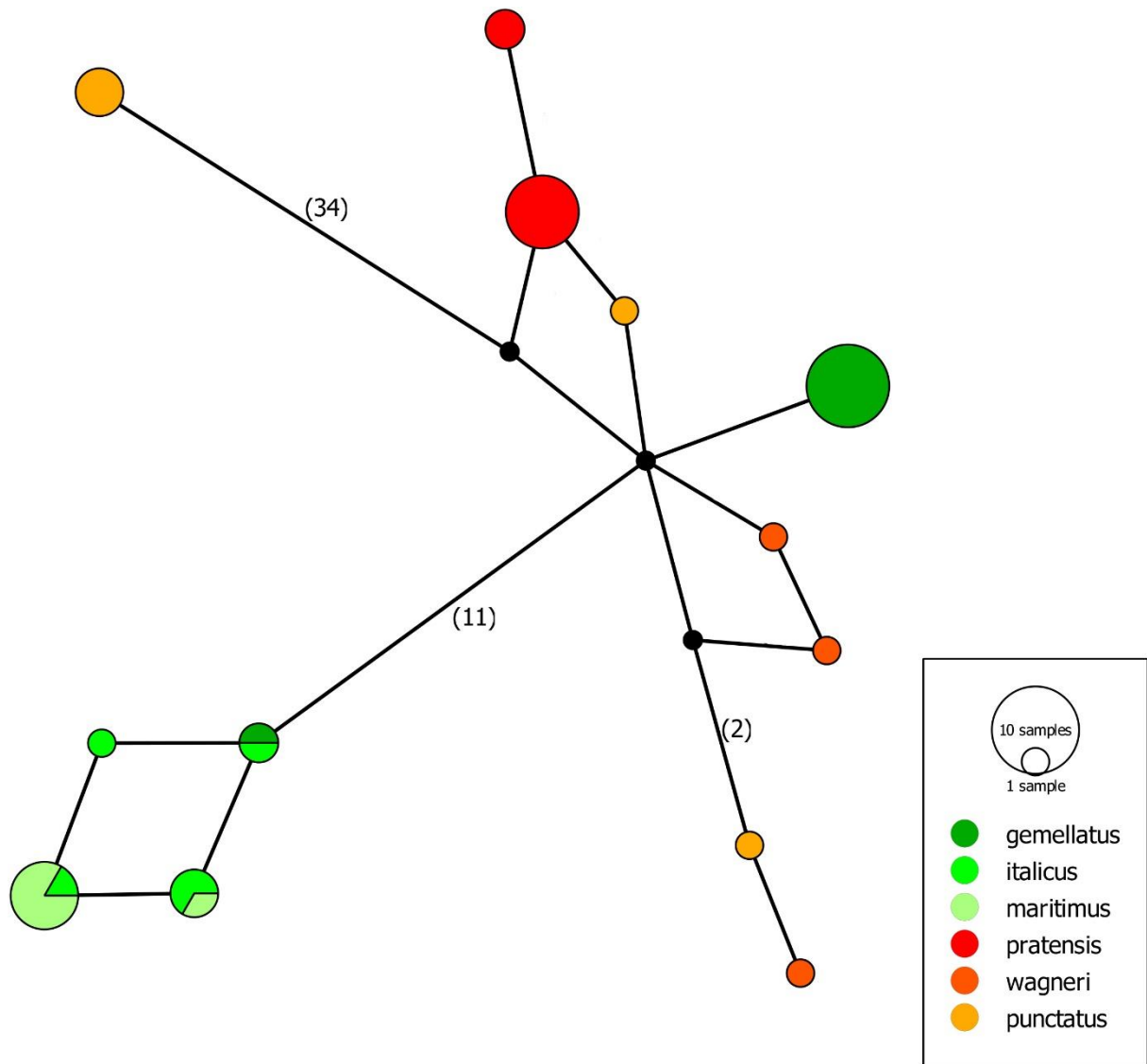


Figure 6 : Réseau d'haplo-types issus de la concaténation des séquences nucléaires des *Lygus* européens

Annexe 13 : Clé d'identification des espèces de *Lygus*

susceptibles d'être rencontrées en cultures légumières.

Attention :

Cette clé prend en compte les trois espèces de *Lygus* susceptibles d'être collectées en cultures légumières.

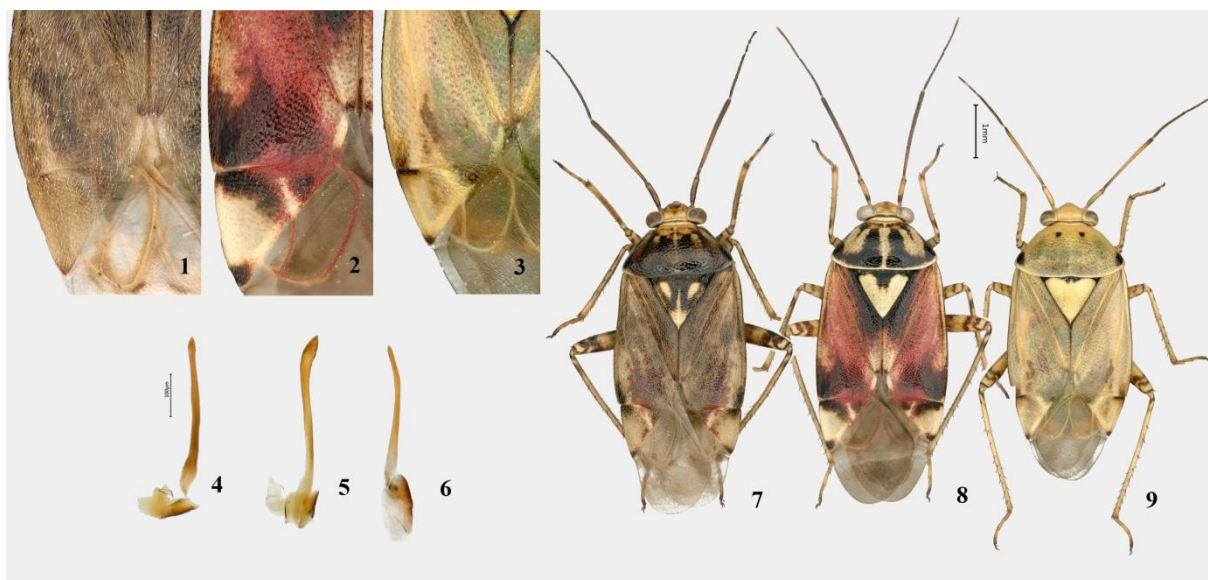
L'identification de ces espèces est délicate et nécessite une dissection. L'examen de la pilosité dorsale et du spicule contenu dans le pénis du mâle permet une identification relativement fiable. Toutefois les études moléculaires ont révélé l'existence probable d'hybrides qu'il n'est pas possible de détecter ni d'identifier morphologiquement.

1. Surface des hémélytres couverte d'une pilosité dense (fig. 1, 7), les poils sont longs et se chevauchent ce qui donne un aspect mât à l'insecte. Spicule du pénis court et effilé portant quelques spinules à l'extrémité (fig. 4).....*L. rugulipennis*

1'. Surface des hémélytres brillante portant une pilosité plus courte et éparse, les poils ne se chevauchent pas (fig. 2 et 3).....**2**

2. Surface de l'hémélytre ponctuée fortement et régulièrement ne laissant pas d'espaces sans ponctuation (fig. 2, 8). Spicule du pénis robuste, élargi apicalement en palette ou pinceau et portant de nombreux spinules (fig. 5).....*L. pratensis*

2'. Surface de l'hémélytre plus faiblement ponctuée il existe notamment vers la partie apicale des zones où il manque des ponctuations (fig. 3, 9). Spinule du pénis court et fin, effilé à l'extrémité et ne portant pas ou très peu de spinules (fig. 6).....*L. gemellatus*



Annexe 14 : Photos des spécimens de *Lygus* du tableau 14

1^{ère} ligne : trois spécimens dont la position phylogénétique change en fonction des gènes étudiés.

2^{ème} ligne : trois spécimens caractéristiques de chacune des espèces retenues dans le mémoire : *L. gemellatus*, *L. pratensis* et *L. rugulipennis*.



JSTR00329_0801 *L. gemellatus*

JSTR03797_0101 *L. sp.*

JSTR05209_0101 *L. gemellatus*



L. gemellatus



L. pratensis



L. rugulipennis

ECOLE PRATIQUE DES HAUTES ETUDES

Science de la vie et de la terre

Caractérisation moléculaire et morphologique des punaises d'intérêt agronomique (genres *Eurydema* et *Lygus*)

Guénaëlle GENSON

Soutenu le 02 décembre 2020

RESUME

Du fait de la montée en puissance de l'agriculture biologique, et de la politique agricole préconisant de réduire l'usage d'insecticides et autres pesticides, les dégâts occasionnés par les punaises phytophages sont en augmentation depuis une dizaine d'années et peuvent conduire à des pertes importantes de production en cultures légumières sous abri. Dans le même temps, il est apparu que la connaissance sur la caractérisation, la biologie et le comportement en culture de plusieurs espèces de punaises phytophages étaient encore à améliorer pour permettre de mettre au point des stratégies globales de protection. Mon travail s'inscrit dans ce cadre et s'intègre dans une approche de gestion de l'agriculture durable et concerne plus particulièrement la caractérisation des espèces de deux genres de punaises ravageuses de cultures légumières composant les deux parties du mémoire ; le genre *Eurydema* qui est uniquement ravageur de crucifères et connu sous le nom de « punaises des choux », et le genre *Lygus*, polyphage. Plusieurs approches vont être abordées dans une démarche de taxinomie intégrative pour répondre aux questions d'identification.

Pour le genre *Eurydema*, l'identification morphologique semble satisfaisante mais l'utilisation du « barcoding » code-barres standard avec le fragment du gène COI (658pb) a révélé des complexes d'espèces insoupçonnés notamment *Eurydema dominulus* (Scopoli, 1763) / *Eurydema cyanea* (Fieber, 1864), mais aussi de nouveaux clades géographiques chez *Eurydema ornata* (Linnaeus, 1758), trois espèces sur lesquelles mon travail sera focalisé. L'emploi de plusieurs autres marqueurs moléculaires Cytb, 28S et ITS permet de confirmer les résultats trouvés sur le COI. L'utilisation de l'approche morphométrique géométrique par la méthode Procruste au niveau de ces trois espèces est une technique à approfondir car peu de spécimens ont été testés.

La caractérisation morphologique des espèces du genre *Lygus* est complexe et le « barcoding » se montre insuffisant pour résoudre l'identification. L'ajout de gènes supplémentaires (Cytb, ND5, 28S et ITS) n'apporte pas d'amélioration significative. Seule l'espèce *L. rugulipennis* se sépare des autres espèces européennes et se révèle plus proche des taxons américains. La morphométrie géométrique de contour met en évidence la variabilité saisonnière chez les *Lygus* souvent énoncée dans la littérature mais jamais démontrée jusqu'à ce jour mais ne permet pas, non plus, de distinguer les espèces. L'apport du RADseq renforce l'idée que plusieurs espèces devraient être mises en synonymie.

Cette démarche de taxinomie intégrative avec l'utilisation combinée de techniques de biologie moléculaire, de caractères morphologiques et de morphométrie géométrique permet de conclure sur deux synonymies d'espèces dans le genre *Lygus* et donner des pistes de recherche d'identification pour explorer les complexes d'espèces présents dans le genre *Eurydema*.

MOTS CLES : Barcoding, *Eurydema*, *Lygus*, morphométrie géométrique, RADseq, cultures légumières, variabilité saisonnière, taxinomie intégrative.